

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-520289

(P2016-520289A)

(43) 公表日 平成28年7月14日(2016.7.14)

(51) Int.Cl.

**C 12 Q** 1/68 (2006.01)  
**C 12 N** 15/09 (2006.01)  
**G 01 N** 33/68 (2006.01)  
**A 61 P** 1/18 (2006.01)  
**A 61 P** 35/00 (2006.01)

F 1

C 12 Q 1/68  
C 12 N 15/00  
G 01 N 33/68  
A 61 P 1/18  
A 61 P 35/00

Z N A A

A  
4 B 0 2 4  
4 B 0 6 3  
4 C 0 8 4  
4 C 0 8 5

テーマコード(参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-502049 (P2016-502049)  
(86) (22) 出願日 平成26年3月13日 (2014.3.13)  
(85) 翻訳文提出日 平成27年10月15日 (2015.10.15)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2014/026094  
(87) 國際公開番号 WO2014/151606  
(87) 國際公開日 平成26年9月25日 (2014.9.25)  
(31) 優先権主張番号 61/794,788  
(32) 優先日 平成25年3月15日 (2013.3.15)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 308031072  
オンコメッド ファーマシューティカルズ  
インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 レッ  
ドウッドシティー チェサピーク ドライ  
ブ 800  
(74) 代理人 100102978  
弁理士 清水 初志  
(74) 代理人 100102118  
弁理士 春名 雅夫  
(74) 代理人 100160923  
弁理士 山口 裕孝  
(74) 代理人 100119507  
弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵臓癌の治療方法

## (57) 【要約】

膵臓癌を治療する新規な方法が提供される。一態様では、方法は、膵臓癌細胞におけるNOTCH mRNA発現レベルを決定する段階を含む。別の態様では、方法は、それを必要とする対象に、治療上有効量のNOTCHアンタゴニストを投与する段階をさらに含む。

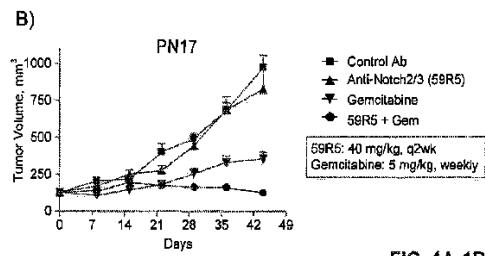
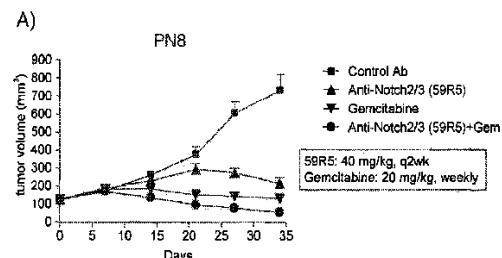


FIG. 1A-1B

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

- NOTCH阻害剤による治療のための膵臓癌患者を選択するための方法であって、  
(a)該患者由来の腫瘍細胞における1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルを決定する段階であって、該1つまたは複数のバイオマーカーがNOTCH3を含む、段階、および  
(b)該1つまたは複数のバイオマーカーの発現レベルに基づいて該患者を選択する段階を含む、方法。

**【請求項 2】**

膵臓癌と診断された患者がNOTCH阻害剤ベースの療法に応答する可能性があるかどうか、またはNOTCH阻害剤による治療を継続すべきかどうかを判定するための方法であって、該方法が該患者由来の腫瘍細胞における1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルを決定する段階を含み、該1つまたは複数のバイオマーカーがNOTCH3を含み、該1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルが、該患者が療法に応答する可能性があることを示す、方法。

10

**【請求項 3】**

患者における膵臓癌を治療する方法であって、  
(a)該患者由来の腫瘍細胞における1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルを決定する段階であって、該1つまたは複数のバイオマーカーがNOTCH3を含む、段階；および  
(b)該患者に、治療上有効量のNOTCH阻害剤を投与する段階を含む、方法。

20

**【請求項 4】**

バイオマーカーの各々が、該バイオマーカーについての参照レベルを上回るレベルで発現されていると決定される、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 5】**

1つまたは複数のバイオマーカーの発現レベルが、該バイオマーカーのmRNAのレベルまたは該バイオマーカーのタンパク質のレベルを測定することによって決定される、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 6】**

バイオマーカーのmRNAのレベルが、定量的ポリメラーゼ連鎖反応によってまたはアレイハイブリダイゼーションによって測定される、請求項5記載の方法。

30

**【請求項 7】**

バイオマーカーがNOTCH3であり、そのmRNAレベルが  
(a)SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:38、およびSEQ ID NO:41からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するフォワードプライマー；  
(b)SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、およびSEQ ID NO:42からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するリバースプライマー；ならびに/または  
(c)SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、およびSEQ ID NO:43からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブを用いて測定される、請求項6記載の方法。

**【請求項 8】**

NOTCH3のmRNAレベルが  
(a)SEQ ID NO:35の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:36の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:37の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ；  
(b)SEQ ID NO:38の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:39の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:40の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ；または  
(c)SEQ ID NO:41の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:42の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:43の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ

40

50

を用いて測定される、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

1つまたは複数のバイオマーカーがMAML2をさらに含み、MAML2発現のレベルがMAML2発現についての参照レベルを上回っていると決定される、請求項1～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

バイオマーカーの参照レベルが所定の値であるか、または対照サンプル中の該バイオマー  
カーの発現のレベルである、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

NOTCH3発現についての参照レベルが、膵臓癌または膵臓癌のサブセットにおけるNOTCH3  
発現についての25パーセンタイル値、30パーセンタイル値、40パーセンタイル値、50パー  
センタイル値、60パーセンタイル値、70パーセンタイル値、75パーセンタイル値、または  
80パーセンタイル値である、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。 10

【請求項 12】

前記患者からサンプルを取得する段階を含む、請求項1～11のいずれか一項記載の方法  
。

【請求項 13】

前記サンプルが全血、血漿、血清、または組織である、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

前記サンプルが膵臓腫瘍サンプルである、請求項12または13記載の方法。 20

【請求項 15】

前記サンプルがホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織である、請求項12～14のい  
ずれか一項記載の方法。

【請求項 16】

NOTCH阻害剤を前記患者に投与する段階をさらに含む、請求項1、2、または4～15のい  
ずれか一項記載の方法。

【請求項 17】

NOTCH阻害剤がセクレターゼ阻害剤または抗NOTCH抗体である、請求項1～16のい  
ずれか一項記載の方法。

【請求項 18】

抗NOTCH抗体がヒトNOTCH2および/またはヒトNOTCH3に特異的に結合する、請求項17記載  
の方法。 30

【請求項 19】

抗NOTCH抗体が、ATCCにPTA-9547として寄託されたポリヌクレオチドによりコードされ  
る、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

抗NOTCH抗体がヒトNOTCH2および/またはヒトNOTCH3に特異的に結合し、該抗体が、  
(a)SSSGMS(SEQ ID NO:3)を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG(SEQ ID NO:4)

を含む重鎖CDR2、およびSIFYTT(SEQ ID NO:9)もしくはGIFFAI(SEQ ID NO:5)を含む重鎖CD  
R3；ならびに

RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:7)を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFP(SEQ ID NO:8)  
を含む軽鎖CDR3

を含むか；または

(b)SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、もしくはSEQ ID NO:26に対して少なくとも約90%の  
配列同一性を有する重鎖可変領域；およびSEQ ID NO:29もしくはSEQ ID NO:27に対して少  
なくとも約90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域  
を含む、請求項17記載の方法。 40

【請求項 21】

抗NOTCH抗体が、ヒトNOTCH2および/またはNOTCH3への特異的結合について、

(a)SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:18を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:29を含む軽鎖可変領域を含む、抗体と；

(b)SSSGMS(SEQ ID NO:3)を含む重鎖CDR1、  
VIASSGSNTYYADSVKG(SEQ ID NO:4)

を含む重鎖CDR2、およびSIFYTT(SEQ ID NO:9)を含む重鎖CDR3、ならびに  
RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:7)を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFP(SEQ ID NO:8)  
を含む軽鎖CDR3を含む、抗体と；

(c)ATCCにPTA-9547として寄託されたポリヌクレオチドによりコードされる抗体と  
からなる群より選択される抗体と競合する、請求項17記載の方法。 10

#### 【請求項 2 2】

抗NOTCH抗体がモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、または抗体断片である、請求項17～21のいずれか一項記載の方法。

#### 【請求項 2 3】

第2の治療剤を投与する段階をさらに含み、任意で、第2の治療剤が化学療法剤、ヌクレオシド類似体、または有糸分裂阻害剤である、請求項3または16～22のいずれか一項記載の方法。

#### 【請求項 2 4】

SEQ ID NO:35～43からなる群より選択される配列を含む単離されたポリヌクレオチドを含む、診断用組成物。 20

#### 【請求項 2 5】

(a)SEQ ID NO:35の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:36の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:37の配列を有するポリヌクレオチド；

(b)SEQ ID NO:38の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:39の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:40の配列を有するポリヌクレオチド；または

(c)SEQ ID NO:41の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:42の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:43の配列を有するポリヌクレオチド  
を含む、請求項24記載の診断用組成物。

#### 【請求項 2 6】

サンプル中のNOTCH3 mRNAを検出する方法であって、該サンプルを、SEQ ID NO:35～43  
からなる群より選択される配列を含むポリヌクレオチドと接触させる段階を含む、方法。 30

#### 【請求項 2 7】

前記サンプルを、

(a)SEQ ID NO:35の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:36の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:37の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ；

(b)SEQ ID NO:38の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:39の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:40の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ；または

(c)SEQ ID NO:41の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:42の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:43の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ  
と接触させる段階を含む、請求項26記載の方法。 40

#### 【請求項 2 8】

サンプル中のNOTCH3 mRNAを検出するためのキットであって、SEQ ID NO:35～43からなる群より選択される配列を含むポリヌクレオチドを含む、キット。

#### 【請求項 2 9】

(a)SEQ ID NO:35の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:36の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:37の配列を有するポリヌクレオチド； 50

(b) SEQ ID NO:38の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:39の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:40の配列を有するポリヌクレオチド；または

(c) SEQ ID NO:41の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:42の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:43の配列を有するポリヌクレオチドを含む、請求項28記載のキット。

#### 【請求項 3 0】

SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、およびSEQ ID NO:42からなる群より選択される配列を有するプライマー。

#### 【請求項 3 1】

SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、およびSEQ ID NO:43からなる群より選択される配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【技術分野】

##### 【0 0 0 1】

##### 関連出願の相互参照

本出願は、2013年3月15日に出願された米国仮出願第61/794,788号の優先権の恩典を主張するものであり、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

##### 【0 0 0 2】

##### 発明の分野

本発明の分野は、一般に、膵臓癌を治療する方法に関する。一態様において、この方法は、膵臓癌細胞におけるNOTCH遺伝子発現レベルを測定する段階を含む。別の態様において、この方法は、それを必要とする対象に、治療上有効量のNOTCHアンタゴニストを投与する段階をさらに含む。

##### 【背景技術】

##### 【0 0 0 3】

##### 発明の背景

NOTCHシグナル伝達経路は、胚パターン形成、後胚期組織の維持、および幹細胞生物学のいくつかの重要な調節因子の一つである。調節されていないNOTCHシグナル伝達は多くのヒト癌に関連しており、癌においてはそれが腫瘍細胞の発生的運命を変えて、それらを未分化の増殖状態に維持し得る(Brennan and Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69 (非特許文献1))。したがって、幹細胞集団による正常な発達および組織修復を制御する恒常性維持機構(homeostatic mechanism)を奪うことによって、発癌が進行し得る(Beachy et al., 2004, Nature 432:324 (非特許文献2))。

##### 【0 0 0 4】

NOTCH受容体は、大きな細胞外ドメイン内に多数のタンデム上皮成長因子(EGF)様リピートおよび3つのシスティンリッチNOTCH/LIN-12リピートを含む、1回膜貫通型受容体である(Wharton et al., 1985, Cell 43:567 (非特許文献3) ; Kidd et al., 1986, Mol. Cell Biol. 6:3094 (非特許文献4) ; Artavanis et al., 1999, Science 284:770 (非特許文献5) に掲載)。4種の哺乳動物NOTCHタンパク質が同定されており(NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3およびNOTCH4)、これらの受容体の突然変異は、以下で詳細に説明するように、発生異常およびいくつかの癌を含むヒト病変を常にもたらす(Gridley, 1997, Mol. Cell Neurosci. 9:103 (非特許文献6) ; Joutel & Tournier-Lasserve, 1998, Semin. Cell Dev. Biol. 9:619-25 (非特許文献7))。

##### 【0 0 0 5】

異常なNOTCHシグナル伝達は、多くのヒト悪性腫瘍、例えば、T細胞急性リンパ芽球性白血病、乳癌、子宮頸癌、腎細胞癌、頭頸部扁平上皮癌に関与している。異常なNOTCHシグナル伝達はまた、膵臓癌の発症にも関与している。例えば、Mazur et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107(30):13438-43 (2010) (非特許文献8) ; Wang et al., Cancer Res. 69(6):2400-7 (2009) (非特許文献9) ; Doucas et al., J. Surg. Oncol. 97(1):63-8 (2008) (非特許文献10) ; Yao and Qian, Med. Oncol. 27(3):1017-22 (2010) (非特許文

10

20

30

40

50

献11)；およびGungor et al., Cancer Res. 71(14):5009-19 (2011) (非特許文献12)を参照されたい。

#### 【0006】

膵臓癌は、癌による死亡原因の第4位にあたり、生存期間の中央値が6ヶ月で、5年生存率が3~5%といった惨たんたる数字であり、この数字は過去25年間にわたって比較的一定している(Iovanna et al., Front. Oncol. 2012; 2: 6 (非特許文献13))。局所性疾患と診断された患者の場合でさえ、5年生存率はわずか15%である。膵臓癌の致命的な性質は、リンパ系および遠隔臓器に急速に広がりやすいことが原因である。効果的な化学療法の欠如とともに、診断時に肉眼で発見できない転移または臨床的な転移の存在は、膵臓癌患者における高い死亡率の一因となっている。

10

#### 【0007】

膵臓癌は、本質的に最も薬剤耐性の腫瘍の一つであり、化学療法剤に対する耐性が膵臓癌における治療の失敗の主な原因である。ゲムシタビンは、進行性膵臓癌の患者のための標準的な化学療法用の薬物である(Burris et al., Eur. J. Cancer 1997, 33:S18-22 (非特許文献14))。最近、5-FU、イリノテカンおよびオキサリプラチニンを組み合わせた多剤化学療法レジメン(FOLFIRINOX)は、ゲムシタビンに比べて、全生存をほぼ倍増することが示されたが、管理しやすいものの、増大した毒性を犠牲にしており、その使用はパフォーマンスステータスが良好な患者に限られている。その上、全生存期間は12ヶ月未満であった(Conroy et al., N. Engl. J. Med. 2011, 364:1817-25 (非特許文献15))。したがって、薬剤耐性を克服し、膵臓癌と診断された患者のための臨床転帰を改善することができる新たな標的治療戦略を設計する必要性が存在している。

20

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0008】

【非特許文献1】Brennan and Brown, 2003, Breast Cancer Res. 5:69

【非特許文献2】Beachy et al., 2004, Nature 432:324

【非特許文献3】Wharton et al., 1985, Cell 43:567

【非特許文献4】Kidd et al., 1986, Mol. Cell Biol. 6:3094

【非特許文献5】Artavanis et al., 1999, Science 284:770

【非特許文献6】Gridley, 1997, Mol. Cell Neurosci. 9:103

30

【非特許文献7】Joutel & Tournier-Lasserve, 1998, Semin. Cell Dev. Biol. 9:619-2  
5

【非特許文献8】Mazur et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107(30):13438-43 (2010)

【非特許文献9】Wang et al., Cancer Res. 69(6):2400-7 (2009)

【非特許文献10】Doucas et al., J. Surg. Oncol. 97(1):63-8 (2008)

【非特許文献11】Yao and Qian, Med. Oncol. 27(3):1017-22 (2010)

【非特許文献12】Gungor et al., Cancer Res. 71(14):5009-19 (2011)

【非特許文献13】Iovanna et al., Front. Oncol. 2012; 2: 6

40

【非特許文献14】Burris et al., Eur. J. Cancer 1997, 33:S18-22

【非特許文献15】Conroy et al., N. Engl. J. Med. 2011, 364:1817-25

#### 【発明の概要】

#### 【0009】

一局面において、本発明は、NOTCH阻害剤による治療のための膵臓癌患者を選択するための方法であって、(a)患者由来の腫瘍細胞における1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルを決定する段階であって、1つまたは複数のバイオマーカーがNOTCH3を含む、段階、および(b)1つまたは複数のバイオマーカーの発現レベルに基づいて患者を選択する段階を含む、方法を提供する。

#### 【0010】

別の局面において、本発明は、膵臓癌と診断された患者がNOTCH阻害剤ベースの療法に

50

応答する可能性があるかどうかを判定するための方法であって、方法は患者由来の腫瘍細胞における1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルを決定する段階を含み、1つまたは複数のバイオマーカーはNOTCH3を含み、1つまたは複数のバイオマーカーの発現レベルは、患者が療法に応答する可能性があることを示す、方法を提供する。

【0011】

別の局面において、本発明は、膵臓癌と診断された患者にNOTCH阻害剤を投与すべきかどうかを判定するための方法であって、方法は患者由来の腫瘍細胞における1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルを決定する段階を含み、1つまたは複数のバイオマーカーはNOTCH3を含み、1つまたは複数のバイオマーカーの発現レベルは、患者がNOTCH阻害剤による治療に対して良好な応答を有することを予測する、方法を提供する。

10

【0012】

別の局面において、本発明は、膵臓癌と診断された患者がNOTCH阻害剤による治療を継続すべきかどうかを判定するための方法であって、方法は患者由来の腫瘍細胞における1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルを決定する段階を含み、1つまたは複数のバイオマーカーはNOTCH3を含み、1つまたは複数のバイオマーカーの発現レベルは、患者が治療に応答する可能性があることを示す、方法を提供する。

【0013】

別の局面において、本発明は、膵臓癌と診断された患者がNOTCH阻害剤による治療を継続すべきかどうかを判定するための方法であって、方法は患者由来の腫瘍細胞における1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルを決定する段階を含み、1つまたは複数のバイオマーカーはNOTCH3を含み、1つまたは複数のバイオマーカーの発現レベルは、患者がNOTCH阻害剤による治療に対して良好な応答を有することを予測する、方法を提供する。  
。

20

【0014】

別の局面において、本発明は、患者における膵臓癌を治療するためのNOTCH阻害剤の治療効果を判定するための方法であって、方法は患者由来の腫瘍細胞における1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルを決定する段階を含み、1つまたは複数のバイオマーカーはNOTCH3を含み、1つまたは複数のバイオマーカーの発現レベルは、NOTCH阻害剤の治療効果を示す、方法を提供する。

30

【0015】

別の局面において、本発明は、患者における膵臓癌を治療する方法であって、(a)患者由来の腫瘍細胞における1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルを決定する段階であって、1つまたは複数のバイオマーカーがNOTCH3を含む、段階；および(b)患者に治療上有効量のNOTCH阻害剤を投与する段階を含む、方法を提供する。

【0016】

別の局面において、本発明は、NOTCH阻害剤による治療のために膵臓癌患者集団を階層化するための方法であって、(a)患者由来の腫瘍細胞における1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルを決定する段階であって、1つまたは複数のバイオマーカーがNOTCH3を含む、段階；および(b)腫瘍細胞における1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルに基づいて患者集団を階層化する段階を含む、方法を提供する。

40

【0017】

特定の態様において、NOTCH3発現のレベルは、NOTCH3発現の参照レベルを上回っていると決定される。特定の態様では、バイオマーカーの各々は、バイオマーカーについての参照レベルを上回るレベルで発現されていると決定される。

【0018】

特定の態様において、1つまたは複数のバイオマーカーの発現レベルは、バイオマーカーのmRNAのレベルまたはバイオマーカーのタンパク質のレベルを測定することによって決定される。特定の態様では、NOTCH3発現のレベルは、腫瘍細胞におけるNOTCH3 mRNAのレベルを測定することによって決定される。特定の態様では、NOTCH3 mRNAのレベルは定量的ポリメラーゼ連鎖反応によって測定される。特定の態様では、NOTCH3 mRNAのレベルは

50

、以下を用いて測定される：(a) SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:38、およびSEQ ID NO:41からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するフォワードプライマー；(b) SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、およびSEQ ID NO:42からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するリバースプライマー；ならびに/または(c) SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、およびSEQ ID NO:43からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ。特定の態様では、NOTCH3 mRNAのレベルは、以下を用いて測定される：(a) SEQ ID NO:35の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:36の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:37の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ；(b) SEQ ID NO:38の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:39の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:40の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ；または(c) SEQ ID NO:41の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:42の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:43の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ。特定の態様では、NOTCH3 mRNAのレベルはアレイハイブリダイゼーションによって測定される。特定の態様では、NOTCH3発現のレベルは、腫瘍細胞により発現されたNOTCH3タンパク質のレベルを測定することによって決定される。

10

#### 【0019】

特定の態様において、1つまたは複数のバイオマーカーはNOTCH3からなる。特定の態様では、1つまたは複数のバイオマーカーはMAML2をさらに含み、かつMAML2発現のレベルはMAML2発現についての参照レベルを上回っていると決定される。特定の態様では、1つまたは複数のバイオマーカーはNOTCH3およびMAML2からなる。特定の態様では、MAML2発現のレベルは、腫瘍細胞におけるMAML2 mRNAのレベルを測定することによって決定される。特定の態様では、MAML2発現のレベルは、腫瘍細胞により発現されたMAML2タンパク質のレベルを測定することによって決定される。

20

#### 【0020】

別の局面において、本発明は、患者における膵臓癌を治療する方法であって、方法は患者に、治療上有効量のNOTCH阻害剤を投与する段階を含み、患者からの膵臓腫瘍細胞の少なくとも一部は、1つまたは複数のバイオマーカーの各々をそのバイオマーカーについての参照レベルを上回るレベルで発現しており、かつ/または1つまたは複数のバイオマーカーの各々をそのバイオマーカーについての参照レベルを上回るレベルで発現すると以前に決定されており、1つまたは複数のバイオマーカーはNOTCH3を含む、方法を提供する。特定の態様では、NOTCH3発現のレベルは、NOTCH3 mRNAのレベルとして測定される。特定の態様では、NOTCH3発現のレベルは、NOTCH3タンパク質のレベルとして測定される。特定の態様では、1つまたは複数のバイオマーカーはNOTCH3からなる。特定の態様では、1つまたは複数のバイオマーカーはMAML2をさらに含み、MAML2発現のレベルはMAML2発現についての参照レベルを上回っている。特定の態様では、1つまたは複数のバイオマーカーはNOTCH3およびMAML2からなる。

30

#### 【0021】

本明細書に記載される方法の特定の態様では、バイオマーカーの参照レベルは所定の値である。特定の態様では、バイオマーカーの参照レベルは、対照サンプル中の該バイオマーカーの発現のレベルである。特定の態様では、NOTCH3発現についての参照レベルは、膵臓癌または膵臓癌のサブセットにおけるNOTCH3発現についての25パーセンタイル値、30パーセンタイル値、40パーセンタイル値、50パーセンタイル値、60パーセンタイル値、70パーセンタイル値、75パーセンタイル値、または80パーセンタイル値である。特定の態様では、NOTCH3発現についての参照レベルは、膵臓癌におけるNOTCH3発現についての75パーセンタイル値である。特定の態様では、NOTCH3発現についての参照レベルは、膵臓癌におけるNOTCH3発現についての50パーセンタイル値である。特定の態様では、NOTCH3発現についての参照レベルは、NOTCH3発現についての25パーセンタイル値である。特定の態様では、NOTCH3発現についての参照レベルは、NOTCH3発現についての75パーセンタイル値である。特定の態様では、NOTCH3発現についての参照レベルは、膵臓腺癌、転移性膵臓腫瘍、肝臓および/もしくはリンパ節転移性膵臓腫瘍、または化学療法抵抗性膵臓癌におけるNOTCH3発現についての75パーセンタイル値である。特定の態様では、NOTCH3発現についての参照レ

40

50

ベルは、脾臓腺癌、転移性脾臓腫瘍、肝臓および/もしくはリンパ節転移性脾臓腫瘍、または化学療法抵抗性脾臓癌におけるNOTCH3発現についての50パーセンタイル値である。特定の態様では、NOTCH3発現についての参考レベルは、脾臓腺癌、転移性脾臓腫瘍、肝臓および/もしくはリンパ節転移性脾臓腫瘍、または化学療法抵抗性脾臓癌におけるNOTCH3発現についての25パーセンタイル値である。

#### 【0022】

特定の態様において、本明細書に記載の方法は、患者から生体サンプルを取得する段階をさらに含む。特定の態様では、NOTCH3の発現のレベルは、患者から得られた生体サンプル中のレベルである。特定の態様では、サンプルは全血、血漿、血清、または組織である。特定の態様では、サンプルは脾臓腫瘍サンプルである。特定の態様では、サンプルは肝臓に転移した脾臓腫瘍からのものである。特定の態様では、サンプルはホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織である。

10

#### 【0023】

本明細書に記載される方法の特定の態様では、患者はヒトであるか、または患者集団はヒト集団である。

#### 【0024】

本明細書に記載される方法の特定の態様では、脾臓癌は腺癌である。特定の態様では、脾臓癌は化学療法抵抗性である。

20

#### 【0025】

特定の態様において、本明細書に記載の方法は、患者にNOTCH阻害剤を投与する段階を含む。特定の態様では、NOTCH阻害剤はセクレターゼ阻害剤である。特定の態様では、NOTCH阻害剤は抗NOTCH抗体である。

20

#### 【0026】

特定の態様において、抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2またはヒトNOTCH3に特異的に結合する。特定の態様では、抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2およびNOTCH3に特異的に結合する。特定の態様では、抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2のEGFリピート10に特異的に結合する。特定の態様では、抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH3のEGFリピート9に特異的に結合する。特定の態様では、抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH3のEGFリピート9とNOTCH2のEGFリピート10の両方に結合する抗原結合部位を含む。

30

#### 【0027】

特定の態様において、NOTCH阻害剤は、ヒトNOTCH2および/またはNOTCH3のアンタゴニストである。特定の態様では、NOTCH阻害剤は、ヒトNOTCH2および/またはNOTCH3へのリガンドの結合を阻害する。特定の態様では、NOTCH阻害剤は、ヒトNOTCH2および/またはNOTCH3のシグナル伝達を阻害する。

30

#### 【0028】

特定の態様において、抗NOTCH抗体は、ATCCにPTA-9547として寄託されたポリヌクレオチドによりコードされる。

#### 【0029】

特定の態様において、抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2および/またはNOTCH3に特異的に結合し、(a)SSSGMS(SEQ ID NO:3)を含む重鎖CDR1、

40

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:4)

を含む重鎖CDR2、およびSIFYTT(SEQ ID NO:9)を含む重鎖CDR3；ならびに(b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:7)を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFPI (SEQ ID NO:8)を含む軽鎖CDR3を含む。特定の態様では、抗NOTCH抗体はヒトNOTCH2および/またはNOTCH3に特異的に結合し、(a)SSSGMS(SEQ ID NO:3)を含む重鎖CDR1、

40

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:4)

を含む重鎖CDR2、およびGIFFAI(SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR3；ならびに(b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:7)を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFPI (SEQ ID NO:8)

50

を含む軽鎖CDR3を含む。

【0030】

特定の態様において、抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2および/またはNOTCH3に特異的に結合し、(a)SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、またはSEQ ID NO:26に対して少なくとも約90%の配列同一性を有する重鎖可変領域；および(b)SEQ ID NO:29またはSEQ ID NO:27に対して少なくとも約90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、抗NOTCH抗体は、(a)SEQ ID NO:17に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域；および(b)SEQ ID NO:29に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、抗NOTCH抗体は、(a)SEQ ID NO:18に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域；および(b)SEQ ID NO:29に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、抗NOTCH抗体は、(a)SEQ ID NO:17を含む重鎖可変領域；および(b)SEQ ID NO:29を含む軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、抗NOTCH抗体は、(a)SEQ ID NO:17を含む重鎖可変領域；および(b)SEQ ID NO:29を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【0031】

特定の態様において、抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2および/またはNOTCH3への特異的結合について、(a)SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:18を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:29を含む軽鎖可変領域を含む、抗体と；(b)SSSGMS(SEQ ID NO:3)を含む重鎖CDR1、VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:4)

20

を含む重鎖CDR2、およびSIFYTT(SEQ ID NO:9)を含む重鎖CDR3、およびRASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:7)を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFP1(SEQ ID NO:8)を含む軽鎖CDR3を含む、抗体と；

(c)ATCCにPTA-9547として寄託されたポリヌクレオチドによりコードされる抗体とからなる群より選択される抗体と競合する。

【0032】

特定の態様において、抗NOTCH抗体はモノクローナル抗体である。特定の態様では、抗NOTCH抗体はキメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、または抗体断片である。

30

【0033】

特定の態様において、本明細書に記載の方法は、第2の治療剤を投与する段階をさらに含む。特定の態様では、第2の治療剤は化学療法剤である。特定の態様では、第2の治療剤はヌクレオシド類似体または有糸分裂阻害剤である。特定の態様では、第2の治療剤はゲムシタビン、パクリタキセル、アルブミン結合パクリタキセル、またはこれらの組み合わせである。

【0034】

別の局面において、本発明は、SEQ ID NO:35～43からなる群より選択される配列を含む単離されたポリヌクレオチドを含む、診断用組成物を提供する。特定の態様では、診断用組成物は、(a)SEQ ID NO:35の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:36の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:37の配列を有するポリヌクレオチド；(b)SEQ ID NO:38の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:39の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:40の配列を有するポリヌクレオチド；または(c)SEQ ID NO:41の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:42の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:43の配列を有するポリヌクレオチドを含む。

40

【0035】

別の局面において、本発明は、サンプル中のNOTCH3 mRNAを検出する方法であって、サンプルを、SEQ ID NO:35～43からなる群より選択される配列を含むポリヌクレオチドと接触させる段階を含む、方法を提供する。特定の態様では、この方法は、サンプルを、(a)SEQ ID NO:35の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:36の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:37の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ；(b)SEQ ID NO:38の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:39の配列を有するリ

50

ベースプライマー、およびSEQ ID NO:40の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ；または(c)SEQ ID NO:41の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:42の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:43の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブと接触させる段階を含む。

【0036】

別の局面において、本発明は、サンプル中のNOTCH3 mRNAを検出するためのキットであって、SEQ ID NO:35～43からなる群より選択される配列を含むポリヌクレオチドを含む、キットを提供する。特定の態様では、このキットは、(a)SEQ ID NO:35の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:36の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:37の配列を有するポリヌクレオチド；(b)SEQ ID NO:38の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ

10

ID NO:39の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:40の配列を有するポリヌクレオチド；または(c)SEQ ID NO:41の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:42の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:43の配列を有するポリヌクレオチドを含む。

【0037】

別の局面において、本発明は、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID N 0:39、SEQ ID NO:41、およびSEQ ID NO:42からなる群より選択される配列を有するプライマーを提供する。

【0038】

別の局面において、本発明は、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、およびSEQ ID NO:43からなる群より選択される配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブを提供する。

20

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1A】PN8膵臓腫瘍細胞における単剤としての、または化学療法剤との併用での、OMP-59R5の活性。

【図1B】PN17膵臓腫瘍細胞における単剤としての、または化学療法剤との併用での、OMP-59R5の活性。

【図1C】PN11膵臓腫瘍細胞における単剤としての、または化学療法剤との併用での、OMP-59R5の活性。

【図1D】UM-PE13乳房腫瘍細胞における単剤としての、または化学療法剤との併用での、OMP-59R5の活性。

30

【図1E】UM-T1乳房腫瘍細胞における単剤としての、または化学療法剤との併用での、OMP-59R5の活性。

【図1F】OMP-Lu40肺腫瘍細胞における単剤としての、または化学療法剤との併用での、OMP-59R5の活性。

【図1G】OMP-Lu53肺腫瘍細胞における単剤としての、または化学療法剤との併用での、OMP-59R5の活性。

【図2A】NOTCH3遺伝子発現とOMP-59R5腫瘍抑制の相関。ゲムシタビンと組み合わせたOMP-59R5抗体による膵臓腫瘍抑制の程度は、膵臓腫瘍細胞におけるNOTCH3遺伝子発現のレベルと有意に相関する。

40

【図2B】NOTCH3遺伝子発現とOMP-59R5腫瘍抑制の相関。ゲムシタビンと組み合わせたOMP-59R5抗体治療に応答性(R)および非応答性(NR)である膵臓腫瘍におけるNOTCH3遺伝子発現の分布。NOTCH3遺伝子発現の分布は、サンプルの最小値、下位四分位点、中央値、上位四分位点およびサンプルの最大値を表すボックスプロットとして示される。

【図3】RNAseqにより測定された、ゲムシタビンと組み合わせたOMP-59R5抗体治療に応答性および非応答性である膵臓腫瘍におけるNOTCH3遺伝子発現。NOTCH3遺伝子発現はRPKM(Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads)として測定された。

【図4】予測指標としてNOTCH3遺伝子発現に基づいた、膵臓腫瘍におけるゲムシタビンと組み合わせたOMP-59R5抗体治療に対する応答の予測された確率。

【図5】予測指標としてNOTCH3およびMAML2遺伝子の発現に基づいた、膵臓腫瘍における

50

ゲムシタピンと組み合わせたOMP-59R5抗体治療に対する応答の予測された確率。

【図6A】膵臓腫瘍におけるNOTCH3発現。膵臓腫瘍におけるNOTCH3遺伝子およびタンパク質の発現。

【図6B】膵臓腫瘍におけるNOTCH3発現。ゲムシタピンと組み合わせたOMP-59R5抗体治療に応答性(R)および非応答性(NR)である膵臓腫瘍におけるNOTCH3タンパク質発現の分布。NOTCH3タンパク質発現の分布は、サンプルの最小値、下位四分位点、中央値、上位四分位点およびサンプルの最大値を示すボックスプロットとして示される。

【図7】膵臓癌の転移性組織におけるNOTCH3遺伝子発現。NOTCH3遺伝子発現はRT-PCRによって測定された。NOTCH3遺伝子発現の分布は、特定の腫瘍タイプのサンプル内で観察されたサンプルの最小値、下位四分位点、中央値、上位四分位点およびサンプルの最大値を示すボックスプロットとして示される。垂直方向の破線は、全ての転移性膵臓腫瘍サンプルにわたって観察された10、25、50、75、および90パーセンタイルのNOTCH3発現値を表す。

【図8】肝臓およびリンパ節膵臓癌転移性組織、ならびに異種移植腫瘍におけるNOTCH3遺伝子発現。NOTCH3遺伝子発現はRT-PCRによって測定された。NOTCH3遺伝子発現の分布は、特定の腫瘍タイプのサンプル内で観察されたサンプルの最小値、下位四分位点、中央値、上位四分位点およびサンプルの最大値を示すボックスプロットとして示される。垂直の破線は、リンパ節および肝臓転移性膵臓腫瘍サンプルにおいて観察された10、25、50、75、および90パーセンタイルのNOTCH3発現値を表す。

【図9】OMP-59R5は、ゲムシタピンおよびアブラキサン(ABRAXANE(商標))；タンパク質結合パクリタキセルとの併用で膵臓腫瘍において活性がある。

【発明を実施するための形態】

【0040】

#### 発明の詳細な説明

本発明は、広義には、NOTCH阻害剤を使用して膵臓癌を治療する方法に向けられる。本発明は、NOTCH阻害剤による治療のために膵臓癌患者集団を階層化するための方法、NOTCH阻害剤による治療のために膵臓癌患者を選択するための方法、膵臓癌と診断された患者がNOTCH阻害剤ベースの療法に応答する可能性があるかどうかを判定するための方法、膵臓癌と診断された患者にNOTCH阻害剤を投与すべきかどうかを判定するための方法、膵臓癌と診断された患者がNOTCH阻害剤による治療を継続すべきかどうかを判定するための方法、ならびに患者における膵臓癌を治療するためのNOTCH阻害剤の治療効果を判定するための方法を提供する。ある態様では、方法は、患者由来の腫瘍細胞におけるNOTCH3遺伝子発現のレベルを決定する段階を含む。ある態様では、本明細書に提供される方法は、患者由来の腫瘍細胞におけるMAML2遺伝子発現のレベルを決定する段階をさらに含む。ある態様では、本明細書に提供される方法は、NOTCH阻害剤を投与する段階を含む。ある態様では、NOTCH阻害剤は、1つのヒトNOTCH受容体に特異的に結合する抗体であるか、または2つ以上のヒトNOTCH受容体に結合する抗体である。ある態様では、抗体は化学療法剤との併用で投与される。ある態様では、化学療法剤はヌクレオシド類似体または有糸分裂阻害剤である。

【0041】

#### 1. 定義

本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語および語句を以下で定義する。

【0042】

「NOTCH」は、特に発生において、多くの細胞プロセスを調節する膜結合型の転写因子である。リガンドの結合に応答して、その細胞内ドメイン(ICD)が2つのプロテアーゼにより放出される。放出された細胞内ドメインは、核に入り、転写を活性化するためにDNA結合タンパク質と相互作用する。NOTCHおよび関連タンパク質の細胞外ドメインは、最大36のEGF様ドメインを含み、その後に3つのノッチ(DSL)ドメインが続く。細胞内ドメイン(ICD)は、6つのアンキリンリピートと、PESTドメインが含まれるカルボキシル末端の伸長を含む。NOTCH1およびNOTCH2のICDはさらに、トランス活性化ドメイン(TAD)を含む。「NOTCH」は、NOTCH受容体ファミリーの全てのメンバーを包含する。NOTCHシグナル伝達経路お

10

20

30

40

50

およびそれにより影響される疾患の説明は、例えば、WO 98/20142およびWO 00/36089に、見出すことができる。

#### 【0043】

哺乳類にはNOTCHファミリーの4つのメンバーが存在する：NOTCH1(TAN1)、NOTCH2、NOTCH3およびNOTCH4/Int-4。ヒトNOTCHタンパク質の例示的な配列としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：ヒトNOTCH1は、Genbankアクセッション番号NM\_017617.3として示されるmRNA配列によりコードされ、かつGenbankアクセッション番号NP\_060087として示されるアミノ酸配列を有する；ヒトNOTCH2は、Genbankアクセッション番号NM\_024408として示されるmRNA配列によりコードされ、かつGenbankアクセッション番号NP\_077719として示されるアミノ酸配列を有する；ヒトNOTCH3は、Genbankアクセッション番号NM\_000435.2のmRNA配列によりコードされ、かつGenbankアクセッション番号NP\_000426のアミノ酸配列を有する；およびヒトNOTCH4は、Genbankアクセッション番号NM\_004557のmRNA配列によりコードされ、かつGenbankアクセッション番号NP\_004548のアミノ酸配列を有する。

10

#### 【0044】

本明細書で使用される「NOTCH阻害剤」、「NOTCHアンタゴニスト」、「抗NOTCH治療剤」、または「抗NOTCH剤」には、NOTCH経路の生物学的活性を部分的にまたは完全に遮断する、阻害する、または中和する、任意の化合物が含まれる。例示的なNOTCH阻害化合物としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：セクレターゼ阻害剤、例えば、III-31-C、N-[N-(3,5-ジフルオロフェナセチル)-L-アラニル]S-フェニルグリシンt-ブチルエステル(DAPT)、compound E、D-ヘリックスペプチド294、イソクマリン類、BOC-Lys(Cbz)Ile-Leu-エポキシド、および(Z-LL)2-ケトン(Kornilova et al., J. Biol. Chem. 2003, 278: 16479-16473参照)；ならびにWO 01/90084、WO 02/30912、WO 01/70677、WO 03/013506、WO 02/36555、WO 03/093252、WO 03/093264、WO 03/093251、WO 03/093253、WO 02/004/039800、WO 2004/039370、WO 2005/030731、WO 2005/014553、WO 2004/089911、WO 02/081435、WO 02/081433、WO 03/018543、WO 2004/031137、WO 2004/031139、WO 2004/031138、WO 2004/101538、WO 2004/101539、WO 02/47671、および米国特許出願第2003/0114496号に記載される化合物。特定のセクレターゼ阻害化合物はまた、米国特許第6,984,663号および第7,304,094号にも記載されている。特定の抗体NOTCH阻害剤は、本明細書に、ならびにWO 2010/005566およびWO 2010/005567に記載されており、これらの全ては参考により本明細書に組み入れられる。また、NOTCH阻害剤にはNOTCHリガンドアンタゴニストも含まれる。

20

#### 【0045】

「NOTCH阻害剤」、「NOTCHアンタゴニスト」、「抗NOTCH治療剤」、または「抗NOTCH剤」には、NOTCH受容体に結合する抗体も含まれる。用語「抗体」は、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位を介して、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、またはこれらの組み合わせなどの、標的を認識して、それに特異的に結合する、免疫グロブリン分子を意味する。本明細書で使用される用語「抗体」は、インタクトなポリクローナル抗体、インタクトなモノクローナル抗体、抗体断片(例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sup>2</sup>、およびFv断片)、単鎖Fv(scFv)突然変異体、多重特異性抗体、例えば少なくとも2つのインタクト抗体から作製される二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原決定部を含む融合タンパク質、および抗体が所望の生物活性を示す限りは抗原認識部位を含む他の任意の修飾免疫グロブリン分子を包含する。抗体は免疫グロブリンの5つの主要なクラスのいずれのものであってもよい：IgM、IgG、IgA、IgD、IgE、およびμと呼ばれる重鎖定常ドメインの正体に基づいて、それぞれ、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、またはそのサブクラス(アイソタイプ)(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)。異なるクラスの免疫グロブリンは、よく知られた異なるサブユニット構造および三次元立体配置を有する。抗体は裸であってもよいし、毒素、放射性同位元素などの他の分子にコンジュゲート化されていてもよい。

30

#### 【0046】

抗体の「可変領域」は、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域を、単独でまた

40

50

は組み合わせで、指す。重鎖および軽鎖の可変領域はそれぞれ、超可変領域としても知られる3つの相補性決定領域(CDR)により接続された4つのフレームワーク領域(FR)から成る。各鎖のCDRは、FRによってごく接近して一緒に保持され、他の鎖からのCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。CDRを決定するための少なくとも2つの技術が存在する：(1)異種間の配列変化に基づくアプローチ(すなわち、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.))；および(2)抗原-抗体複合体の結晶学的研究に基づくアプローチ(AI-lazikani et al., J. Molec. Biol. 1997, 273:927-948))。さらに、これら2つのアプローチの組み合わせも、CDRを決定するために当技術分野で時に使用されることがある。

## 【0047】

10

用語「抗体断片」は、インタクト抗体の一部を指し、かつインタクト抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体断片の例としては、限定するものではないが、Fab、Fab'、F(ab')2、およびFv断片、直鎖状抗体、単鎖抗体、ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。

## 【0048】

「モノクローナル抗体」は、単一の抗原決定基、つまりエピトープ、の高度に特異的な認識および結合に関与する均質な抗体集団を指す。これは、一般的に異なる抗原決定基に対する異なる抗体を含む、ポリクローナル抗体とは対照的である。用語「モノクローナル抗体」は、インタクトな全長モノクローナル抗体ならびに抗体断片(Fab、Fab'、F(ab')2、Fv)、単鎖(scFv)突然変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含む他の任意の修飾免疫グロブリン分子を包含する。さらに、「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、およびトランスジェニック動物による方法を含むがこれらに限定されない、多数の方法で作製されたこのような抗体を指す。

20

## 【0049】

用語「ヒト化抗体」は、最小限の非ヒト(例えば、マウス)配列を含む、特定の免疫グロブリン鎖、キメラ免疫グロブリン、またはその断片である、非ヒト(例えば、マウス)抗体の形態を指す。一般的に、ヒト化抗体は、その相補性決定領域(CDR)からの残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター)のCDRからの残基で置き換えられたヒト免疫グロブリンである(Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536)。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)の残基は、所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種由来の抗体中の対応する残基で置き換えられる。ヒト化抗体は、抗体特異性、親和性、および/または能力をさらに洗練し、最適化するために、Fvフレームワーク領域において、かつ/または置き換えられた非ヒト残基内で、追加の残基の置換によってさらに修飾ができる。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに対応するCDR領域の全てまたは実質上全てを含む少なくとも1つの、典型的には2つまたは3つの、可変ドメインの実質上全てを含み、一方FR領域の全てまたは実質上全てはヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリンの定常領域またはドメイン(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれを含むことができる。ヒト化抗体を作製するために使用される方法の例は、米国特許第5,225,539号に記載されている。

30

## 【0050】

40

用語「ヒト抗体」は、ヒトによって産生された抗体、または当技術分野で公知の技術を用いて作製された、ヒトによって産生された抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を意味する。ヒト抗体のこの定義は、インタクトもしくは全長抗体、その断片、および/または少なくとも1つのヒト重鎖および/または軽鎖ポリペプチドを含む抗体、例えば、マウス軽鎖およびヒト重鎖ポリペプチドを含む抗体などを包含する。

50

## 【0051】

用語「キメラ抗体」は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が2つ以上の種に由来する抗体を指す。典型的には、軽鎖と重鎖の両方の可変領域は、所望の特異性、親和性、およ

び能力を有する、哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギなど)の1つの種に由来する抗体の可変領域に対応し、一方で定常領域は、別の種(通常はヒト)に由来する抗体の配列に相同であり、結果としてその種における免疫応答の誘発が回避される。

#### 【0052】

用語「エピトープ」または「抗原決定基」は、本明細書では交換可能に使用され、特定の抗体によって認識されかつ特異的に結合され得る抗原の部分を指す。抗原がポリペプチドである場合、エピトープは、タンパク質の三次フォールディングによって並置された連続アミノ酸と非連続アミノ酸の両方から形成され得る。連続アミノ酸から形成されたエピトープは、タンパク質の変性時に一般的に保持されるのに対して、三次フォールディングによって形成されたエピトープは、タンパク質の変性時に一般的に失われる。エピトープは、典型的には、固有の空間的立体構造中に少なくとも3個、通常は少なくとも5個または8~10個のアミノ酸を含む。10

#### 【0053】

ポリペプチドまたは他の作用物質(例えば、抗体または可溶性受容体)がタンパク質に「特異的に結合する」とは、そのポリペプチドまたは他の作用物質が、非関連タンパク質などの別の物質よりも該タンパク質と、より頻繁に、より迅速に、より長く継続して、より高い親和性で、または上記のいくつかの組み合わせで、反応または会合することを意味する。特定の態様では、「特異的に結合する」とは、例えば、作用物質(例えば、抗体または可溶性受容体)が、約0.1mM以下のK<sub>D</sub>で、より一般的には約1μM未満のK<sub>D</sub>で、タンパク質に結合することを意味する。特定の態様では、「特異的に結合する」とは、作用物質(例えば、抗体または可溶性受容体)が、時には少なくとも約0.1μM以下、少なくとも約0.01μM以下、またほかの時には少なくとも約1nM以下のK<sub>D</sub>で、タンパク質に結合することを意味する。異なる種における相同タンパク質間の配列同一性のため、特異的結合は、複数の種におけるNOTCH受容体のような特定のタンパク質を認識する作用物質(例えば、抗体または可溶性受容体)を含むことができる。同様に、異なるパラログ(例えば、異なるヒトNOTCHタンパク質)間のそれらの配列の特定の領域における相同性のため、特異的結合は、複数のパラログ(例えば、複数のヒトNOTCHタンパク質)を認識するポリペプチドまたは作用物質(例えば、抗体または可溶性受容体)を含むことができる。理解されるように、第1の標的に特異的に結合する作用物質(例えば、抗体または可溶性受容体)は、第2の標的に特異的に結合してもしなくてよい。このように、「特異的結合」は、排他的な結合、すなわち単一の標的への結合を(含めることができるが)必ずしも必要としない。したがって、作用物質(例えば、抗体または可溶性受容体)は、特定の態様では、複数の標的(例えば、複数の異なるヒトNOTCHタンパク質、例えばNOTCH1、NOTCH2、NOTCH3および/またはNOTCH4)に特異的に結合してもよい。特定の態様において、ある抗体の複数の標的是、抗体上の同じ抗原結合部位によって結合され得る。例えば、抗体は、ある場合には、2つの同一の抗原結合部位を含むことができ、それらの各々は2つ以上のヒトフリズルド(frizzled)受容体(例えば、ヒトNOTCH1、NOTCH2、NOTCH3および/またはNOTCH4)に特異的に結合する。特定の別の態様では、抗体は二重特異性であって、特異性の異なる少なくとも2つの抗原結合部位を含むことができる。非限定的な例として、二重特異性抗体は、ヒトNOTCH2などの1つのNOTCH受容体上のエピトープを認識する1つの抗原結合部位を含み、さらにヒトNOTCH3などの第2のNOTCH受容体上の異なるエピトープを認識する第2の異なる抗原結合部位を含む。一般的に、必ずしもそうではないが、結合への言及は特異的な結合を意味する。203040

#### 【0054】

用語「癌」および「癌性」とは、細胞の集団が無秩序な細胞増殖により特徴づけられる哺乳動物における生理学的状態を指す、または言い表す。癌という用語は、NOTCH依存性の癌を包含するものと理解される。癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0055】

「腫瘍」および「新生物」は、良性(非癌性)または前癌病変を含む悪性(癌性)のいずれかの、過剰な細胞成長または増殖に起因する組織の塊を指す。50

## 【0056】

本明細書で使用される「転移」とは、癌が発生部位から身体の他の領域に、新しい場所での同様の癌性病変の発生を伴って、広がるまたは移動するプロセスを指す。「転移」または「転移性」細胞は、隣接細胞との付着性接触を失って、疾患の原発部位から血流またはリンパを経て移行して近隣の身体構造に入り込む細胞である。

## 【0057】

用語「癌幹細胞」、「腫瘍幹細胞」、または「固形腫瘍幹細胞」は、本明細書では交換可能に使用され、(1)広範な増殖能力を有し；(2)増殖能または発生能が低下した1種類以上の分化した子孫を生み出す非対称細胞分裂が可能であり；かつ(3)自己再生または自己維持のための対称細胞分裂が可能である、固形腫瘍からの細胞の集団を指す。「癌幹細胞」、「腫瘍幹細胞」、または「固形腫瘍幹細胞」のこれらの特性は、こうした癌幹細胞に、腫瘍を形成できない大多数の腫瘍細胞と比較して、免疫不全マウスへの連続移植時に触知可能な腫瘍を形成する能力を付与する。癌幹細胞は無秩序な様式で分化に対して自己再生を遂げて、突然変異の発生につれて経時的に変化し得る異常な細胞型をもった腫瘍を形成する。

10

## 【0058】

用語「癌細胞」、「腫瘍細胞」、およびその文法上の等価語は、腫瘍細胞集団の大部分を含む非腫瘍形成性細胞と腫瘍形成性幹細胞(癌幹細胞)の両方を含めて、腫瘍または前癌病変に由来する細胞の集団全体を指す。本明細書で使用される用語「腫瘍細胞」は、再生および分化する能力を欠く腫瘍細胞にのみ言及する場合に、「非腫瘍形成性」という用語で修飾することによって、こうした腫瘍細胞を癌幹細胞から区別することにする。

20

## 【0059】

用語「腫瘍形成性」とは、固形腫瘍幹細胞が腫瘍を形成することを可能にする自己再生(さらなる腫瘍形成性の癌幹細胞を生じさせる)および他の全ての腫瘍細胞を生成させる増殖(分化した、それゆえに非腫瘍形成性の、腫瘍細胞を生じさせる)の特性を含めて、固形腫瘍幹細胞の機能的特徴を指す。自己再生および他の全ての腫瘍細胞を生成させる増殖のこうした特性は、連続移植時に腫瘍を形成することができない非腫瘍形成性の腫瘍細胞と比較して、免疫不全マウスへの連続移植時に触知可能な腫瘍を形成する能力を癌幹細胞に付与する。非腫瘍形成性の腫瘍細胞は、固形腫瘍から腫瘍細胞を得た後で、免疫不全マウスに一次移植した際に腫瘍を形成し得るが、これらの非腫瘍形成性の腫瘍細胞は、連続移植した際に腫瘍を生じさせないことが観察されている。

30

## 【0060】

用語「対象」は、特定の治療のレシピエントになるはずの、任意の動物(例えば、哺乳動物)、限定するものではないが、ヒト、非ヒト靈長類、げっ歯類などを指す。一般的に、用語「対象」および「患者」は、ヒト対象に関して本明細書では交換可能に使用される。定量的および定性的データのために本明細書で使用される「正常な」対象または「正常な」対象からのサンプルは、膵臓癌がないと医師により評価されたまたは評価されるであろう対象を指す。

## 【0061】

「対照サンプル」は、対照細胞からの別個のサンプルを意味する。対照細胞は無病であっても、膵臓癌の細胞であってもよい。対照細胞は、同じ対象から、または別の対象から得ることができる。対照細胞は、同じ組織から、または異なる組織から得ることができる。対照細胞は、不死化細胞株に由来するものでもよい。

40

## 【0062】

用語「予後」は、膵臓癌などの腫瘍性疾患の、再発、転移拡散、および薬剤耐性を含めた、進行または死亡に起因する癌の発生可能性の予測を指すために本明細書で使用される。本明細書で使用される用語「予測する」または「予測」は、対象が有意に増加したまたは低下した転帰(outcome)の可能性--不利な予後に対して有利な予後--を有するという所見を出すことを指す。それはまた、NOTCH阻害剤が、治療的であることが見出されないものに対して治療的に有効である、という可能性を含むことができる。この用語はまた、患

50

者が薬物もしくは薬物のセットに有利にまたは不利に応答するという可能性、また、こうした応答の程度を指すために、あるいは原発腫瘍の外科的切除および/または一定期間の化学療法後に癌の再発なしに患者が生存するという可能性を指すために使用することができる。本発明の予測方法は、特定の患者のために最も適切な治療法を選択することによって、治療法を決定するために臨床的に使用することができる。この目的に向けて、本発明の予測方法は、抗NOTCH抗体治療、所定の薬物または薬物の組み合わせ、例えばセクレターゼ阻害剤もしくは別のNOTCH阻害剤、による化学療法などの、NOTCHベースの治療計画に患者が有利に応答する可能性があるかどうかを予測する上で、あるいはNOTCH阻害剤による治療プロトコルおよび/または化学療法もしくは他の治療法の終了後に、患者の長期生存が期待できるかどうかを予測する上で、有益なツールである。

10

## 【0063】

用語「治療上有効量」とは、対象または哺乳動物における疾患もしくは障害を「治療」するのに有効な作用物質(例えば、抗体、可溶性受容体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、小有機分子、または他の薬物)の量を指す。癌の場合、作用物質の治療に有効な量は、以下の効果を奏することができる：癌細胞の数を減らす；腫瘍の大きさを縮小させる；例えば、軟組織および骨への癌の広がりを含む、末梢器官への癌細胞の浸潤を抑制または阻止する；腫瘍転移を抑制および阻止する；腫瘍増殖を抑制および阻止する；癌に関連する症状の1つまたは複数をある程度緩和する；罹患率と死亡率を減らす；生活の質を向上させる；腫瘍の腫瘍原性、腫瘍形成頻度、または腫瘍形成能を低下させる；腫瘍中の癌幹細胞の数または頻度を減らす；腫瘍形成性の細胞を非腫瘍形成性の状態に分化させる；またはこのような効果の組み合わせ。作用物質が増殖を防止しつゝまたは既存の癌細胞を死滅させる限り、それは細胞増殖抑制性および/または細胞傷害性と呼ぶことができる。

20

## 【0064】

本明細書で使用される用語「腫瘍増殖を抑制する」とは、腫瘍細胞の増殖が抑制され得る任意の作用機構を指す。特定の態様では、腫瘍細胞増殖は、腫瘍細胞の増殖を遅くすることによって抑制される。特定の態様では、腫瘍細胞増殖は、腫瘍細胞の増殖を止めることによって抑制される。特定の態様では、腫瘍細胞増殖は、腫瘍細胞を死滅させることによって抑制される。特定の態様では、腫瘍細胞増殖は、腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することによって抑制される。特定の態様では、腫瘍細胞増殖は、腫瘍細胞の分化を誘導することによって抑制される。特定の態様では、腫瘍細胞増殖は、腫瘍細胞から栄養を奪うことによって抑制される。特定の態様では、腫瘍細胞増殖は、腫瘍細胞の移動を防止することによって抑制される。特定の態様では、腫瘍細胞増殖は、腫瘍細胞の浸潤を防止することによって抑制される。

30

## 【0065】

本明細書で使用される用語「階層化する」とは、特定の病状または病態の特徴に基づいて、対象を異なるクラスまたは階層に分類することを指す。例えば、膵臓癌を有する対象の集団を階層化することは、腫瘍細胞におけるNOTCH3遺伝子発現に基づいておよび/または疾患の重症度(例えば、前悪性、悪性、転移性など)に基づいて対象を割り当てることを含む。

40

## 【0066】

「治療する」または「治療」または「緩和する」または「緩和」などの用語は、1)診断された病理学的状態もしくは障害の症状を治癒する、スローダウンさせる、軽くする、および/またはその進行を止める治療的手段と、2)標的とされた病理学的状態もしくは障害を妨げる、および/またはその発症を遅らせる予防的もしくは防止的手段、の両方を指す。したがって、治療を必要とする者には、すでに疾患を有する者、疾患にかかりやすい者、および疾患を予防すべき者が含まれる。特定の態様では、患者が以下の1つまたは複数を示すならば、その対象は本発明の方法による癌の「治療」に成功している：癌細胞の数の減少または完全な消失；腫瘍サイズの縮小；例えば、軟組織および骨への癌の広がりを含む、末梢器官への癌細胞の浸潤の抑制または阻止；腫瘍転移の抑制または阻止；腫瘍増殖の抑制または阻止；特定の癌に関連する1つまたは複数の症状の緩和；罹患率および死

50

亡率の低下；生活の質の向上；腫瘍の腫瘍原性、腫瘍形成頻度、または腫瘍形成能の低下；腫瘍中の癌幹細胞の数または頻度の減少；非腫瘍形成性状態への腫瘍形成性細胞の分化；または効果のいくつかの組み合わせ。

#### 【0067】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、本明細書では交換可能に使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。ポリマーは直鎖状または分枝状であってよく、それは修飾アミノ酸を含んでもよく、かつそれは非アミノ酸が介在してもよい。用語はまた、天然でまたは介入によって修飾されたアミノ酸ポリマーを包含する；例えば、ジスルフィド結合の形成、グリコシリ化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または他の操作もしくは改変、例えば標識成分とのコンジュゲート形成。また、この定義内に含まれるものは、例えば、アミノ酸の1つまたは複数の類似体(例えば、非天然アミノ酸など)を含むポリペプチド、ならびに当技術分野で公知の他の修飾を含むポリペプチドである。なお、本発明のポリペプチドは抗体をベースとするので、特定の態様では、ポリペプチドは一本鎖または会合した鎖として存在し得ることが理解される。

10

#### 【0068】

本明細書で使用される用語「生検」または「生検組織」は、サンプルが癌性組織を含むかどうかを調べる目的で、対象から採取された組織または体液のサンプルを指す。ある態様では、対象に癌の疑いがあるため、生検組織または体液が取得される。その後、生検組織または体液は癌の有無について検査される。

20

#### 【0069】

本開示および特許請求の範囲で使用される単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明確に他を指示しない限り、複数形を含むものである。

#### 【0070】

なお、態様が言語「含む」(comprising)を用いて本明細書に記載されている場合はいつでも、「からなる」(consisting of)および/または「から本質的になる」(consisting essentially of)の用語で記載された、他の点では類似する態様もまた提供される、ことが理解される。

#### 【0071】

本明細書中で「Aおよび/またはB」のような語句で使用される用語「および/または」は、「AおよびB」の両方、「AまたはB」、「A」、および「B」を含むことが意図される。同様に、「A、B、および/またはC」のような語句で使用される用語「および/または」は、次の具体例のそれぞれを包含することが意図される：A、B、およびC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A(単独)；B(単独)；ならびにC(単独)。

30

#### 【0072】

## 2. NOTCH3評価方法

以下で詳細に示すように、抗NOTCH2/3抗体OMP-59R5に対するヒト肺臓腫瘍の感受性は、NOTCH3発現の増加と有意に相關した。驚くべきことに、NOTCH3 mRNAおよびタンパク質の発現は両方とも、ヒト肺臓腫瘍におけるOMP-59R5感受性と相關したが、その相関は、NOTCH3タンパク質発現と治療感受性の間よりもNOTCH3 mRNA発現と治療感受性の間で増加した。これらのデータは、NOTCH2またはNOTCH3発現とOMP-59R5治療に対する腫瘍感受性の間に有意な相関がなかったことを示したヒト乳房腫瘍および結腸腫瘍からの発現データと顕著な対照をなす。同様に、OMP-59R5感受性とNOTCH2発現との間の相関はヒト肺臓腫瘍にも見られなかった。

40

#### 【0073】

肺臓癌における増加または上昇したNOTCH3発現(例えば、NOTCH3過剰発現)と、OMP-59R5治療に対する感受性との相関関係(治療効果)は、腫瘍細胞が上昇もしくは増加したNOTCH3発現、NOTCH3過剰発現または所定のレベル以上でのNOTCH3発現によって特徴づけられる肺臓癌患者をOMP-59R5療法のために選択することにより、肺臓癌の治療方法を改善するために利用することができる。用語「上昇したNOTCH3発現」、「増加したNOTCH3発現」、およ

50

び「NOTCH3過剰発現」は、場合により、本明細書では交換可能に使用される。治療効果はまた、腫瘍細胞が正常なもしくは減少したNOTCH3発現、または所定のレベルより低いNOTCH3発現によって特徴づけられる膵臓癌患者をOMP-59R5療法のために選択しないことにより改善することができる。特定の態様において、所定のNOTCH3発現レベルは、対照サンプル、例えば対照細胞、における発現レベルであり得る。特定の態様では、所定のNOTCH3発現レベルは、膵臓癌におけるNOTCH3発現レベルの中央値、または膵臓癌におけるNOTCH3発現についての95、90、80、75、70、50、40、30、25もしくは10パーセンタイル値とすることができます。

#### 【0074】

特定の態様において、患者は、腫瘍細胞の少なくとも一部が上昇したNOTCH3発現レベルを示す膵臓腫瘍を有する。一態様では、上昇したNOTCH3発現レベルは、膵臓癌におけるNOTCH3発現レベルの中央値以上のレベルである。別の態様では、上昇したNOTCH3発現レベルは、膵臓癌のNOTCH3遺伝子発現についての95、90、80、75、70、50、40、30、25もしくは10パーセンタイル値以上のレベルである。特定の態様では、膵臓癌のNOTCH3発現レベルの中央値は、膵臓腺癌、転移性膵臓癌、肝臓および/もしくはリンパ節転移性膵臓癌、化学療法抵抗性膵臓癌、または進行した、難治性もしくは再発性の膵臓癌のNOTCH3発現レベルの中央値である。特定の態様では、膵臓癌におけるNOTCH3発現についての95、90、80、75、70、50、40、30、25もしくは10パーセンタイル値は、膵臓腺癌、転移性膵臓癌、肝臓および/もしくはリンパ節転移性膵臓癌、化学療法抵抗性膵臓癌、または進行した、難治性もしくは再発性の膵臓癌におけるNOTCH3発現についての95、90、80、75、70、50、40、30、25もしくは10パーセンタイル値である。

10

20

30

40

#### 【0075】

特定の態様において、上昇したNOTCH3発現レベルは、所定の標準レベル、または参照レベル、または対照レベル以上のレベルである。用語「所定の標準」、「参照レベル」、および「対照レベル」は、場合により、本明細書では交換可能に使用される。一態様では、所定の標準は、対照サンプル、例えば、膵臓腫瘍または膵臓癌細胞を含まない膵臓細胞を含むサンプル、において測定されたNOTCH3発現レベルを示す。別の態様では、所定の標準は、膵臓腫瘍細胞、例えば、腺癌、転移性腫瘍細胞、および肝臓またはリンパ節転移性腫瘍細胞を含むサンプルにおいて測定されたNOTCH3発現レベルを示す。さらなる態様では、所定の標準は、NOTCH阻害剤、例えばOMP-59R5、による治療に応答しない膵臓癌細胞を含むサンプルにおいて測定されたNOTCH3発現レベルを示す。さらなる態様では、所定の標準は、NOTCH阻害剤、例えばOMP-59R5、による治療に応答する膵臓癌細胞を含むサンプルにおいて測定されたNOTCH3発現レベルを示す。別の態様では、所定の標準は、単離された細胞株におけるNOTCH3発現レベルである。その細胞株は膵臓癌サンプルから誘導することができる。細胞株はまた、NOTCH3を発現するように組換え的に操作することもできる。特定の態様では、NOTCH3発現の所定の標準レベルまたは参照レベルは、膵臓癌、例えば、膵臓腺癌、転移性膵臓腫瘍、肝臓および/もしくはリンパ節転移性膵臓腫瘍、化学療法抵抗性膵臓癌、または進行した、難治性もしくは再発性の膵臓癌におけるNOTCH3遺伝子発現についての95、90、80、75、70、50、40、30、25もしくは10パーセンタイル値である。

#### 【0076】

特定の態様において、患者は、患者の膵臓腫瘍細胞の少なくとも一部がNOTCH3を高レベルで発現する場合、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)による治療のために選択され、かつ/または該阻害剤により治療される。特定の態様では、患者の膵臓腫瘍細胞の少なくとも一部は、参照レベル以上のレベルでNOTCH3を発現する。特定の態様では、患者の膵臓腫瘍細胞の少なくとも一部は、膵臓癌におけるNOTCH3発現レベルの中央値以上のレベルでNOTCH3を発現する。特定の態様では、患者の膵臓腫瘍細胞の少なくとも一部は、膵臓癌のNOTCH3遺伝子発現についての95、90、80、75、70、50、40、30、25もしくは10パーセンタイル値以上のレベルでNOTCH3を発現する。特定の態様では、患者の膵臓腫瘍細胞の少なくとも一部は、膵臓癌のNOTCH3遺伝子発現についての25パーセンタイル値以上のレベルでNOTCH3を発現する。特定の態様では、患者の膵臓腫瘍細胞の少なくとも一部はまた、参照レベル以

50

上、または膵臓癌におけるMAML2発現レベルの中央値以上、のレベルでMAML2を発現する。一態様では、患者はOMP-59R5による治療のために選択され、かつ/またはOMP-59R5により治療される。別の態様では、患者は、OMP-59R5の6つのCDRおよび/または可変領域を含む抗体による治療のために選択され、かつ/または該抗体により治療される。

## 【0077】

特定の態様において、患者の膵臓腫瘍細胞の少なくとも一部が、(1)参照レベル；(2)膵臓癌におけるNOTCH3 mRNAレベルの中央値；および/または(3)膵臓癌におけるNOTCH3 mRNAレベルの95、90、80、75、70、50、40、30、25もしくは10パーセンタイル値；以上のレベルのNOTCH3 mRNAを含む場合、患者はNOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)を用いた治療のために選択され、かつ/または該阻害剤により治療される。特定の態様では、患者の膵臓腫瘍細胞の少なくとも一部は、膵臓癌における、例えば、肝臓および/またはリンパ節転移性膵臓癌における、NOTCH3 mRNAレベルの25パーセンタイル値以上のレベルのNOTCH3 mRNAを含む。特定の態様では、患者の膵臓腫瘍細胞の少なくとも一部はまた、MAML2 mRNAを、参照レベル以上で、または膵臓癌におけるMAML2 mRNAレベルの中央値以上で含む。一態様では、患者は、OMP-59R5を用いた治療のために選択され、かつ/またはOMP-59R5により治療される。別の態様では、患者は、OMP-59R5の6つのCDRおよび/または可変領域を含む抗体を用いた治療のために選択され、かつ/または該抗体により治療される。

10

## 【0078】

特定の態様において、患者の膵臓腫瘍細胞の少なくとも一部が、(1)参照レベル；(2)膵臓癌におけるNOTCH3タンパク質レベルの中央値；および/または(3)膵臓癌におけるNOTCH3タンパク質レベルの95、90、80、75、70、50、40、30、25もしくは10パーセンタイル値；以上のレベルのNOTCH3タンパク質を含む場合、患者はNOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)を用いた治療のために選択され、かつ/または該阻害剤により治療される。特定の態様では、患者の膵臓腫瘍細胞の少なくとも一部は、膵臓癌における、例えば、肝臓および/またはリンパ節転移性膵臓癌における、NOTCH3タンパク質レベルの25パーセンタイル値以上のレベルのNOTCH3タンパク質を含む。特定の態様では、患者の膵臓腫瘍細胞の少なくとも一部はまた、MAML2タンパク質を、参照レベル以上で、または膵臓癌におけるMAML2タンパク質レベルの中央値以上で含む。一態様では、患者は、OMP-59R5を用いた治療のために選択され、かつ/またはOMP-59R5により治療される。別の態様では、患者は、OMP-59R5の6つのCDRおよび/または可変領域を含む抗体を用いた治療のために選択され、かつ/または該抗体により治療される。

20

## 【0079】

NOTCH3のレベルまたは対象となる他の遺伝子/遺伝子産物(例えば、MAML2)の発現を検出する方法は、核酸またはタンパク質レベルのいずれかでNOTCH3発現のレベルを測定することが可能な任意の方法を含む。このような方法は当技術分野で周知であり、限定するものではないが、以下が挙げられる：ウェスタンプロット、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫沈降、免疫蛍光、フローサイトメトリー、免疫組織化学(IHC)、核酸ハイブリダイゼーション技術、核酸逆転写法、核酸增幅法、例えばPCRまたはqRT-PCR、RNase保護、マイクロアレイ、遺伝子発現の連続分析(SAGE)、ハイスクループロット質量分析(MS)、全トランスクリプトームショットガン配列決定(WTSS)、大規模並列処理特徴配列決定(massively parallel signature sequencing: MPSS)、インサイチューハイブリダイゼーション、およびノーザンプロッティング。

30

## 【0080】

膵臓癌におけるNOTCH3の中央値またはパーセンタイル値の発現レベルは、患者の膵臓腫瘍細胞におけるNOTCH3発現を測定することに関連して、どの時点でも決定することができる。特定の態様では、NOTCH3発現レベルは同時に測定される。別の態様では、膵臓癌におけるNOTCH3の中央値またはパーセンタイル値の発現レベルは、患者のサンプルでのNOTCH3発現レベルの測定に先立って決定される。

40

## 【0081】

一態様では、NOTCH3発現は生体サンプルにおいて測定される。本明細書で使用される語

50

句「生体サンプル」とは、NOTCH3発現のレベルを検出することができる細胞、組織、または体液を含む任意のサンプルを意味する。このような生体サンプルの例としては、限定するものではないが、血液、リンパ液、尿、婦人科体液、生検、羊水および塗抹標本が挙げられる。生体サンプルは、さまざまな技術によって患者から得ることができる。種々の生体サンプルを採取するための方法は、当技術分野で周知である。特定の態様では、生体サンプルは膵臓腫瘍サンプルである。特定の態様では、生体サンプルは、固定されたサンプル、例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)サンプル、または凍結サンプルであり得る。

#### 【0082】

特定の態様では、NOTCH3発現のレベルはmRNAレベルで検出される。mRNAの発現を測定するための種々の方法としては、限定するものではないが、定量的リアルタイムPCR(qRT-PCR)、マイクロアレイ分析、遺伝子発現の連続分析(SAGE)などが挙げられる。特定の態様では、膵臓腫瘍細胞中のmRNAレベルは、定量的リアルタイムPCR(qRT-PCR)、またはマイクロアレイ分析を用いて測定される。多くの発現検出方法は単離されたRNAを使用する。mRNAの単離を選択しないRNA単離技術はどれも、生体サンプルからのRNAの精製に利用することができる(例えば、Ausubel編, 1999, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, New York)を参照されたい)。さらに、多数の組織サンプルは、例えば、Chomczynski(米国特許第4,843,155号)の單一段階RNA単離方法のような、当業者に周知の技術を用いて容易に処理することができる。

10

#### 【0083】

用語「プローブ」は、具体的に意図された標的生体分子、例えばNOTCH3のヌクレオチド転写産物、に選択的に結合することが可能な任意の分子を指す。プローブは、公知の技術を用いて当業者により合成され得るか、または適切な生物学的調製物から誘導され得る。プローブは、検出可能な標識で標識されるように特別に設計され得る。プローブとして使用できる分子の例としては、限定するものではないが、RNA、DNA、タンパク質(ペプチドを含む)、抗体、および有機分子が挙げられる。

20

#### 【0084】

膵臓腫瘍細胞からのNOTCH3 mRNAは、mRNA配列決定法、サザンもしくはノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応分析およびプローブアレイを含むがこれらに限定されない、ハイブリダイゼーションまたは增幅アッセイで検出することができる。mRNAレベルを検出するための1つの方法は、単離されたmRNAを、検出される遺伝子によってコードされたmRNAにハイブリダイズできる核酸分子(プローブ)と接触させる段階を含む。核酸プローブは、例えば、完全長cDNAまたはその一部、例えば、NOTCH3をコードするmRNAまたはゲノムDNAにストリンジエントな条件下で特異的にハイブリダイズするのに十分な、少なくとも7、15、30、50、100、250または500ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドであり得る。mRNAとプローブとのハイブリダイゼーションは、問題の遺伝子が発現されていることを示している。

30

#### 【0085】

一態様では、mRNAを固体表面上に固定させて、プローブと接触させるが、それは、例えば、単離されたmRNAをアガロースゲルで泳動し、mRNAをゲルからニトロセルロースなどの膜に移行させることによって行う。別の態様では、プローブを固体表面上に固定させ、mRNAを、例えばAffymetrix遺伝子チップアレイ(Santa Clara, Calif.)で、プローブと接触させる。公知のmRNA検出方法は、膵臓腫瘍細胞中のNOTCH3 mRNAを測定する際に使用するように容易に適合させることができる。

40

#### 【0086】

サンプル中のNOTCH3 mRNAのレベルを測定するための代替方法は、核酸増幅方法、例えば、RT-PCR(実験例はMullis, 1987, 米国特許第4,683,202号に記載)、リガーゼ連鎖反応(Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189-193)、自律的配列複製(self sustained sequence replication)(Guatelli, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874-1878)、転写増幅系(Kwoh, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173-1177)、Q レプ

50

リカーゼ(Lizardi, 1988, Bio/Technology, 6:1197)、ローリングサークル複製(Lizardi, 米国特許第5,854,033号)による方法、または他の核酸增幅方法、およびその後の当業者に周知の技術を用いた増幅分子の検出を含む。これらの検出スキームは、核酸分子が非常に少数で存在する場合に、そうした分子の検出に特に有用である。本発明の特定の局面では、NOTCH3 mRNAのレベルは、定量的蛍光RT-PCR(すなわち、TaqMan(登録商標)システム)によって評価される。このような方法は、典型的には、NOTCH3遺伝子内のイントロンに隣接するオリゴヌクレオチドプライマーの対を使用する。既知の配列に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを設計するための方法は、当技術分野で知られている。

#### 【0087】

一態様において、本発明は、定量的RT-PCRを用いて、サンプル中のNOTCH3 mRNAのレベルを測定するのに適したプライマーセットを提供する。一態様では、プライマーセットは、SEQ ID NO:35、36および37の配列を含む、3つの単離されたポリヌクレオチドを含む。一態様では、プライマーセットは、SEQ ID NO:38、39および40の配列を含む、3つの単離されたポリヌクレオチドを含む。一態様では、プライマーセットは、SEQ ID NO:41、42および43の配列を含む、3つの単離されたポリヌクレオチドを含む。さらなる局面において、本発明は、サンプル中のNOTCH3 mRNAの存在を検出するための方法であって、サンプルを、SEQ ID NO:35～43の配列を含む少なくとも1つの単離されたオリゴヌクレオチドと接触させる段階を含む、方法を提供する。本明細書に提供されるプライマーセットは、標準的なqRT-PCRの手順に従って、サンプル中のNOTCH3 mRNAのレベルを定量するために使用することができる。

#### 【0088】

本発明の一態様では、生物学的サンプル中のNOTCH3 mRNAのレベルを測定するためにマイクロアレイが使用される。マイクロアレイは、その再現性のため、この目的に特によく適している。DNAマイクロアレイは、多数の遺伝子の発現レベルまたは対象となる分子の異なる部分に向けられた多数のオリゴヌクレオチドプローブを同時に測定するための1つの方法を提供する。各アレイは、固相支持体に結合された捕捉プローブの再現可能なパターンで構成される。標識したRNAまたはDNAが、アレイ上の相補的なプローブにハイブリダイズされ、次いで、例えばレーザースキャニングによって、検出される。アレイ上の各プローブのハイブリダイゼーション強度が測定され、相対的な遺伝子発現レベルを表す定量値に変換される。米国特許第6,040,138号、第5,800,992号、第6,020,135号、第6,033,860号、および第6,344,316号を参照されたい；これらは参考により本明細書に組み入れられる。高密度オリゴヌクレオチドアレイは、サンプル中の多数のRNAの遺伝子発現プロファイルを決定するのに特に有用である。

#### 【0089】

機械的合成方法を用いてこれらのアレイを合成するための技術は、例えば、米国特許第5,384,261号に記載されており、その全体が参考により本明細書に組み入れられる。平面的なアレイ表面が好ましいが、アレイは、実質的にいかなる形状の表面上にも、複数の表面上にさえ、作製することができる。アレイは、ビーズ、ゲル、ポリマー表面、光ファイバーなどの繊維、ガラスまたは任意の他の適切な基板上のペプチドもしくは核酸とすることができ、米国特許第5,770,358号、第5,789,162号、第5,708,153号、第6,040,193号および第5,800,992号を参考されたい；これらの各々はその全体が本明細書に組み入れられる。アレイは、診断または包括的デバイスの他の操作を可能にするようにパッケージングされ得る。例えば、参考により本明細書に組み入れられる米国特許第5,856,174号および第5,922,591号を参考されたい。

#### 【0090】

腫瘍細胞におけるNOTCH3タンパク質のレベルを検出するための方法は、生物学的サンプル中のNOTCH3タンパク質の存在を検出する任意の方法を含むことができる。このような方法は当技術分野で周知であり、限定するものではないが、ウェスタンプロット、スロットプロット、ELISA、免疫沈降、免疫蛍光、フローサイトメトリー、免疫細胞化学、免疫組織化学(IHC)、および質量分析が挙げられる。このようなイムノアッセイ法は、手動でま

10

20

30

40

50

たは自動化された方法で行うことができる。NOTCH3のいずれかの領域に結合する抗体は、本明細書に記載の検出方法において有用である。一態様では、腫瘍サンプル中のNOTCH3タンパク質のレベルは、IHCを用いて測定される。

#### 【0091】

抗体の結合を検出するための技術は当技術分野で周知である。NOTCH3タンパク質への抗体の結合は、抗体結合のレベル、したがって、NOTCH3タンパク質のレベル、に対応する検出可能なシグナルを発生する化学的試薬の使用により、検出することができる。一態様では、抗体の結合は、標識したポリマーにコンジュゲート化された二次抗体の使用を介して検出される。標識ポリマーの例にはポリマー-酵素コンジュゲートが含まれるが、これらに限定されない。こうした複合体中の酵素は、典型的には、抗原-抗体結合部位での色原体の付着を触媒するために使用され、それによって、対象となる変異の発現レベルに対応する細胞染色をもたらす。特に関心がある酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)およびアルカリホスファターゼ(AP)が挙げられる。市販の抗体検出システム、例えば、Dako Envision+システム(Dako North America社, Carpinteria, Calif.)およびMach 3システム(Biocare Medical社, Walnut Creek, Calif.)などは、本発明を実施するために使用することができる。

#### 【0092】

抗体結合の検出は、検出可能な物質に抗体をカップリングすることによって容易にすることができる。検出可能な物質の例には、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射性物質が含まれる。適当な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれる；適当な補欠分子族の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれる；適当な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが含まれる；発光物質の例には、ルミノールが含まれる；生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれる；ならびに適当な放射性物質の例には、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、または $^3\text{H}$ が含まれる。

#### 【0093】

一態様では、NOTCH3タンパク質のレベルは、NOTCH3に特異的に結合する作用剤を用いて測定される。NOTCH3への特異的結合を示す分子実体はどれも、サンプル中のNOTCH3タンパク質のレベルを測定するために使用することができる。特異的結合剤としては、限定するものではないが、抗体、抗体模倣物、およびポリヌクレオチド(例えば、アプタマー)が挙げられる。当業者には理解されるように、必要とされる特異性の程度は、NOTCH3タンパク質の検出に使用される特定のアッセイによって決定される。例えば、全長NOTCH3とNOTCH3-ICDの両方に特異的に結合する作用剤は、ポリペプチドをサイズに基づいて分離する段階を含む方法、例えばウェスタンプロット、において使用することができる。

#### 【0094】

一態様では、NOTCH3タンパク質のレベルは、NOTCH3に特異的な抗体を用いて測定される。別の態様では、その抗体はモノクローナル抗体である。NOTCH3特異的抗体は、当業者に公知の任意の方法に従って作製することができる。例えば、Tagami et al., 2008 Mol. Cell. Biol., 28(1):165-176を参照されたい。NOTCH3特異的抗体はまた、商業的供給源からも入手可能である。例えば、R&D Systems社の抗ヒトNOTCH3ポリクローナル抗体、カタログ番号BAF1559を参照されたい。抗NOTCH3抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、またはこれらの抗原結合断片であり得る。さらなる態様では、抗体は、固定され包埋された組織サンプル中のNOTCH3に特異的に結合する。組織サンプルはホルマリン固定組織サンプルであり得る。組織サンプルはパラフィン包埋組織サンプルであり得る。

#### 【0095】

3. NOTCH阻害剤

10

20

30

40

50

本発明の方法の別の局面は、NOTCH3発現レベルが決定されている膵臓癌患者を治療するためのNOTCH阻害剤(例えば、抗NOTCH抗体)の使用である。特定の態様では、NOTCH阻害剤は抗NOTCH抗体である。特定の態様では、抗NOTCH抗体は、1つまたは複数のヒトNOTCH受容体のEGF10ドメイン(またはEGF10ドメインの等価物)に特異的に結合する。特定の態様では、抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2のEGF10および/またはヒトNOTCH3のEGF9に特異的に結合する。EGF9は、ヒトNOTCH3内のEGFであり、他のヒトNOTCH受容体NOTCH1、NOTCH2、およびNOTCH4のEGF10と同等である。ある態様では、抗NOTCH抗体はNOTCH2のEGF10に特異的に結合する。ある態様では、抗NOTCH抗体はNOTCH2のEGF10およびNOTCH3のEGF9に特異的に結合する。ある態様では、抗NOTCH抗体はNOTCH3のEGF9に特異的に結合する。他の態様では、抗NOTCH抗体は、NOTCH2 EGF10内の配列HKGAL(SEQ ID NO:1)の少なくとも一部に結合する。ある態様では、抗NOTCH抗体は、NOTCH3 EGF9内の配列HEDAI(SEQ ID NO:2)の少なくとも一部に結合する。NOTCH2およびNOTCH3に結合する例示的な抗体は、米国特許第8,226,943号に記載されており、その全体が参考により本明細書に組み入れられる。

10

## 【0096】

特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2および/またはNOTCH3へのリガンドの結合を阻害する。ある態様では、抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2へのリガンドの結合を阻害する。ある態様では、抗NOTCH抗体は、NOTCH2およびNOTCH3へのリガンドの結合を阻害する。他の態様では、抗NOTCH抗体は、NOTCH3へのリガンドの結合を阻害する。特定の態様では、リガンドはDLL4、JAG1またはJAG2である。他の態様では、抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2および/またはNOTCH3のシグナル伝達を阻害する。ある態様では、抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2のシグナル伝達を阻害する。ある態様では、抗NOTCH抗体は、NOTCH2およびNOTCH3のシグナル伝達を阻害する。他の態様では、抗NOTCH抗体は、NOTCH3のシグナル伝達を阻害する。ある態様では、NOTCH2および/またはNOTCH3のシグナル伝達は、DLL4、JAG1またはJAG2によって誘導される。

20

## 【0097】

特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2および/またはNOTCH3に特異的に結合し、(a)SSSGMS(SEQ ID NO:3)を含む重鎖CDR1、VIASSGSNTYYADSVKG(SEQ ID NO:4)

30

を含む重鎖CDR2、および/もしくはSIFYTT(SEQ ID NO:9)を含む重鎖CDR3；ならびに/または(b)

RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:7)を含む軽鎖CDR2、および/もしくはQQYSNFP1(SEQ ID NO:8)を含む軽鎖CDR3を含む。ある態様では、抗体は、(a)SSSGMS(SEQ ID NO:3)を含む重鎖CDR1、または1、2、3もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体；VIASSGSNTYYADSVKG(SEQ ID NO:4)

40

を含む重鎖CDR2、または1、2、3もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体；および/またはSIFYTT(SEQ ID NO:9)を含む重鎖CDR3、または1、2、3もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体；ならびに/または(b)

RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、または1、2、3もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体；GASSRAT(SEQ ID NO:7)を含む軽鎖CDR2、または1、2、3もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体；および/またはQQYSNFP1(SEQ ID NO:8)を含む軽鎖CDR3、または1、2、3もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体を含む。

## 【0098】

特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2および/またはNOTCH3に特異的に結合し、(a)SSSGMS(SEQ ID NO:3)を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG(SEQ ID NO:4)

50

を含む重鎖CDR2、および/もしくはGIFFAI(SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR3；ならびに/または(b)

RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:7)を含む軽鎖CDR2、および/もしくはQQYSNFP1(SEQ ID NO:8)を含む軽鎖CDR3を含む。特定の態様では、抗体はNOTCH2に特異的に結合する。ある態様では、抗体は、(a)SSSGMS(SEQ ID NO:3)を含む重鎖CDR1、または1、2、3もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体；

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:4)

を含む重鎖CDR2、または1、2、3もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体；および/またはGIFFAI(SEQ ID NO:5)を含む重鎖CDR3、または1、2、3もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体；ならびに/または(b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、または1、2、3もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体；GA SSRAT(SEQ ID NO:7)を含む軽鎖CDR2、または1、2、3もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体；および/またはQQYSNFP1(SEQ ID NO:8)を含む軽鎖CDR3、または1、2、3もしくは4つの保存的アミノ酸置換を含むその変異体を含む。

#### 【 0 0 9 9 】

特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2および/またはNOTCH3に特異的に結合し、(a)SSSGMS(SEQ ID NO:3)を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:4)

を含む重鎖CDR2、および/もしくは

(G/S)(I/S)F(F/Y)(A/P)(I/T/S/N) (SEQ ID NO:10)

を含む重鎖CDR3；ならびに/または(b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:7)を含む軽鎖CDR2、および/もしくはQQYSNFP1(SEQ ID NO:8)を含む軽鎖CDR3を含む。ある態様では、抗体は、SIFYPT(SEQ ID NO:11)を含む重鎖CDR3を含む。ある態様では、抗体は、SSSFFAS(SEQ ID NO:12)を含む重鎖CDR3を含む。他の態様では、抗体は、SSFYAS(SEQ ID NO:13)を含む重鎖CDR3を含む。特定の態様では、抗体は、SSFFAT(SEQ ID NO:14)を含む重鎖CDR3を含む。ある態様では、抗体は、SIFYPS(SEQ ID NO:15)を含む重鎖CDR3を含む。さらに他の態様では、抗体は、SSFFAN(SEQ ID NO:16)を含む重鎖CDR3を含む。

#### 【 0 1 0 0 】

特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、(a)SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、もしくはSEQ ID NO:26(シグナル配列を含むまたは含まない)に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する重鎖可変領域；および/または(b)SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:27もしくはSEQ ID NO:28(シグナル配列を含むまたは含まない)に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、抗NOTCH抗体はヒトNOTCH2および/またはNOTCH3に特異的に結合する。ある態様では、抗NOTCH抗体はヒトNOTCH2に特異的に結合する。ある態様では、抗NOTCH抗体はNOTCH2およびNOTCH3に結合する。他の態様では、抗NOTCH抗体はNOTCH3に結合する。特定の態様では、抗NOTCH抗体は、SEQ ID NO:18またはSEQ ID NO:17に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または約100%の配列同一性を有する重鎖可変領域を含む。特定の態様では、抗NOTCH抗体は、SEQ ID NO:29に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または約100%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。

#### 【 0 1 0 1 】

特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、(a)SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31もしくはSEQ ID NO:32(シグナル配列を含むまたは含まない)に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する重鎖；および/または(b)SEQ ID NO:33もしくはSEQ ID NO:34(シグナル配列を含むまたは含まない)に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する軽鎖を含む。特定の態様では、抗NOTCH抗体は、SEQ ID NO:19に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または約100%の配列同一性を有する

10

20

30

40

50

一性を有する重鎖、およびSEQ ID NO:28に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または約100%の配列同一性を有する軽鎖を含む。特定の態様では、抗NOTCH抗体は、SEQ ID NO:30に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または約100%の配列同一性を有する重鎖、およびSEQ ID NO:28に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または約100%の配列同一性を有する軽鎖を含む。

#### 【0102】

特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、(a)SEQ ID NO:17に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する重鎖可変領域；および/または(b)SEQ ID N 0:29に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、抗NOTCH抗体は、SEQ ID NO:17に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または約100%の配列同一性を有する重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:29に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または約100%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。

10

#### 【0103】

特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、SEQ ID NO:31および33(シグナル配列を含むまたは含まない)のそれぞれ重鎖および軽鎖を含むか、または2008年10月15日にブダペスト条約の条件の下でアメリカン・タイプ・コレクション(ATCC)(10801 University Boulevard, Manassas, VA, USA)に寄託されて、指定番号PTA-9547を割り当てられたDNAによってコードされる、59R1 IgG2抗体を含む、からなる、またはから本質的になる。

20

#### 【0104】

特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、SEQ ID NO:30およびSEQ ID NO:33(シグナル配列を含むまたは含まない)のそれぞれ重鎖および軽鎖を含むか、または2009年7月6日にATCCに寄託されて、指定番号PTA-10170を割り当てられたDNAによってコードされる、59R5 IgG2抗体を含む、からなる、またはから本質的になる。特定の態様では、本発明の方法において有用な抗NOTCH抗体は、59R5 IgG2抗体の重鎖および軽鎖(リーダー配列を含むまたは含まない)を含む。特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、59R5 IgG2抗体である。59R5 IgG2抗体は、本明細書ではOMP-59R 5とも呼ばれる。OMP-59R5抗体に関するさらなる情報は、例えば、米国特許第8,226,943号にも見出され、その全体が参考により本明細書に組み入れられる。米国特許第8,226,943号では、OMP-59R5抗体は、「59R5」または「59R5 IgG2抗体」と一般に呼ばれている。

30

#### 【0105】

特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2および/またはNOTCH3への特異的結合について、SEQ ID NO:18を含む重鎖可変領域およびSEQ ID N 0:29を含む軽鎖可変領域を含む抗体と競合する。特定の態様では、抗体は、特異的結合について、SEQ ID NO:31および33(シグナル配列を含むまたは含まない)のそれぞれ重鎖および軽鎖を含むか、または2008年10月15日にATCCに寄託されて、指定番号PTA-9547を割り当てられたDNAによってコードされる59R1 IgG2抗体と競合する。ある態様では、抗体はヒトNOTCH2への結合について競合する。ある態様では、抗体はヒトNOTCH2およびNOTCH3への結合について競合する。他の態様では、抗体はヒトNOTCH3への結合について競合する。

40

#### 【0106】

特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2および/またはNOTCH3への特異的結合について、SEQ ID NO:17を含む重鎖可変領域およびSEQ ID N 0:29を含む軽鎖可変領域を含む抗体と競合する。ある態様では、抗体は、特異的結合について、SEQ ID NO:30および33のそれぞれ重鎖および軽鎖を含むか、または2009年7月6日にATCCに寄託されて、指定番号PTA-10170を割り当てられたDNAによってコードされる59R5抗体と競合する。ある態様では、抗体はヒトNOTCH2への結合について競合する。ある態様では、抗体はヒトNOTCH2およびNOTCH3への結合について競合する。他の態様では、抗体はヒトNOTCH3への結合について競合する。

50

**【 0 1 0 7 】**

特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、IgG1抗体またはIgG2抗体である。特定の態様では、抗体はモノクローナル抗体である。特定の態様では、抗体はヒト抗体またはヒト化抗体である。特定の態様では、抗体は抗体断片である。

**【 0 1 0 8 】**

特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、59R1または59R5抗体のエピトープと同じエピトープに結合するか、または59R1または59R5抗体のエピトープと重複するエピトープに結合する。

**【 0 1 0 9 】**

本発明の方法において有用な抗NOTCH抗体のさらなる例は、米国特許第8,226,943号に開示されており、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。10

**【 0 1 1 0 】**

特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH受容体を特異的に認識する二重特異性抗体である。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープを特異的に認識して結合することが可能な抗体である。一態様では、二重特異性抗NOTCH抗体は、同じヒトNOTCH受容体内の異なるエピトープを特異的に認識する。別の態様では、二重特異性抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH受容体内の異なるエピトープ、または異なるヒトNOTCH受容体上の異なるエピトープを特異的に認識する。

**【 0 1 1 1 】**

あるいは、特定の代替態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、二重特異性抗体でない。20

**【 0 1 1 2 】**

特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、単一特異性である。例えば、特定の態様では、抗体に含まれる1つまたは複数の抗原結合部位の各々は、1つまたは複数の同じヒトNOTCH受容体に結合することが可能である(または結合する)。特定の態様では、単一特異性抗NOTCH抗体の抗原結合部位は、1つ、2つ、3つ、または4つのヒトNOTCH受容体に結合することが可能である(または結合する)。

**【 0 1 1 3 】**

本発明の方法の別の局面は、膵臓癌の治療におけるNOTCH阻害剤(例えば、抗NOTCH抗体)の使用である。特定の態様では、NOTCH阻害剤はセクレターゼの阻害剤である。セクレターゼ阻害剤もまた、NOTCH受容体の活性化を防止することができるので、いくつかの形態のセクレターゼ阻害剤が抗腫瘍効果について試験された。最初に、オリジナルのセクレターゼ阻害剤であるIL-X(cbz-IL-CHO)は、Ras形質転換線維芽細胞においてNOTCH1依存性の抗腫瘍活性を有することが示された。トリペプチドセクレターゼ阻害剤(z-Leu-leu-Nle-CHO)は、細胞株での腫瘍増殖を抑制しつゝまたはメラノーマおよびカポジ肉腫からのマウス内の異種移植片を抑制することが報告された(Curry CL et al., Oncogene 24:6333-44(2005))。ジペプチドセクレターゼ阻害剤N-[N-(3,5-ジフルオロフェナセチル)-L-アラニル]-S-フェニルグリシンt-ブチルエステル(DAPT)を用いた治療もまた、髓芽腫増殖の著しい減少をもたらし、かつT-ALL動物モデルにおいてG0-G1細胞周期の停止およびアポトーシスを誘導した(O'Neil J. et al., Blood 107:781-5 (2006))。別のセクレターゼ阻害剤ジベンザゼピンは、上皮細胞の増殖を抑制し、かつApc-/- (min)マウスにおいて腸腺癌での杯細胞分化を誘導することが示された(van Es JH, et al., Nature 435:959-63 (2005))。最近になって、トリペプチドセクレターゼ阻害剤またはNOTCH3特異的低分子干渉RNAのいずれかによるNOTCH3の機能的不活性化は、NOTCH3を過剰発現する腫瘍細胞株において細胞増殖の抑制およびアポトーシスの誘導をもたらしたが、最少量のNOTCH3発現を有する腫瘍細胞株ではそのようにはならなかった(Park JT et al., Cancer Res. 66:6312-8 (2006))。さらに、NOTCH阻害剤MK0752(Merck社(Whitehouse Station, NJ)により開発された)の第I相臨床試験が、再発性または難治性T-ALL患者および進行性乳癌のために開始されている。304050

**【 0 1 1 4 】**

#### 4. 治療方法

上述したように、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、患者の腫瘍細胞がNOTCH3発現(例えば、NOTCH3 mRNA発現)の増加したレベル、例えば、膵臓癌におけるNOTCH3発現レベルの中央値以上のレベル、膵臓癌のNOTCH3発現についての95、90、80、75、70、50、40、30、25もしくは10パーセンタイル値以上のレベル、または対照サンプルのNOTCH3発現レベル以上のレベルを有すると判定された患者において、膵臓癌を治療するために使用することができる。特定の態様では、腫瘍細胞はまた、MAML2発現(例えば、MAML2 mRNA発現)の増加したレベル、例えば、膵臓癌におけるMAML2発現レベルの中央値以上のレベル、または対照サンプルのMAML2発現レベル以上のレベルを有すると判定されている。特定の態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、腫瘍増殖を抑制し、分化を誘導し、かつ/または腫瘍体積を縮小させるのに有用である。また、本発明は、対象における膵臓腫瘍の腫瘍原性を減少させる方法を提供し、この方法は、腫瘍細胞が本明細書に記載されるように増加したレベルのNOTCH3を発現すると判定された患者に、治療上有効量のNOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)を投与する段階を含む。特定の態様では、腫瘍は癌幹細胞を含む。特定の態様では、腫瘍中の癌幹細胞の頻度がNOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)の投与によって低減される。

10

##### 【0115】

一態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、膵臓癌の腫瘍細胞が対照サンプルまたは対照細胞中のNOTCH3発現のレベル以上のNOTCH3発現のレベルを有することを特徴とする膵臓癌を治療するために、使用することができる。一態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、膵臓癌の腫瘍細胞が膵臓癌のNOTCH3発現レベルの中央値以上のNOTCH3遺伝子発現のレベルを有することを特徴とする膵臓癌を治療するために、使用することができる。特定の態様では、治療される膵臓癌は、膵臓癌におけるNOTCH3発現についての95、90、80、75、70、50、40、30、25もしくは10パーセンタイル値以上のNOTCH3発現のレベルを有することを特徴とする腫瘍細胞を含む。特定の態様では、膵臓癌のNOTCH3発現レベルの中央値は、膵臓腺癌、転移性膵臓癌、または肝臓および/もしくはリンパ節転移性膵臓癌のNOTCH3発現レベルの中央値である。特定の態様では、膵臓癌におけるNOTCH3発現についての95、90、80、75、70、50、40、30、25または10パーセンタイル値は、膵臓腺癌、転移性膵臓癌、または肝臓および/もしくはリンパ節転移性膵臓癌におけるNOTCH3発現についての95、90、80、75、70、50、40、30、25または10パーセンタイル値である。特定の態様では、NOTCH3発現レベルはqRT-PCRを用いて測定される。特定の態様では、NOTCH3発現レベルは、本明細書に記載されるプローブを用いて、例えば、SEQ ID NO:35～43からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを用いて、測定される。

20

##### 【0116】

一態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、腫瘍細胞の少なくとも一部が対照細胞におけるMAML2発現のレベル以上のMAML2発現レベルを示す、腫瘍細胞を含む膵臓癌を治療するために使用することができる。一態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、腫瘍細胞の少なくとも一部が膵臓癌のMAML2発現レベルの中央値以上のMAML2発現レベルを示す、腫瘍細胞を含む膵臓癌を治療するために使用することができる。特定の態様では、治療される膵臓癌は、腫瘍細胞の少なくとも一部が膵臓癌におけるMAML2発現についての95、90、80、75、70、50、40、30、25もしくは10パーセンタイル値以上のMAML2発現のレベルを示す、腫瘍細胞を含む。特定の態様では、膵臓癌のMAML2発現レベルの中央値は、膵臓腺癌、転移性膵臓癌、または肝臓および/もしくはリンパ節転移性膵臓癌のMAML2発現レベルの中央値である。特定の態様では、膵臓癌におけるMAML2発現についての95、90、80、75、70、50、40、30、25または10パーセンタイル値は、膵臓腺癌、転移性膵臓癌、または肝臓および/もしくはリンパ節転移性膵臓癌におけるMAML2発現についての95、90、80、75、70、50、40、30、25または10パーセンタイル値である。特定の態様では、MAML2発現レベルはqRT-PCRを用いて測定される。

30

##### 【0117】

特定の態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)により治療される膵臓癌は、膵臓の

40

50

外分泌腫瘍である。特定の態様では、治療される膵臓癌は、腺房細胞癌、腺癌、腺扁平上皮癌、巨細胞腫、管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)、粘液性囊胞腺癌、膵芽腫、漿液性囊胞腺癌、または充実性偽乳頭腫瘍(solid and pseudopapillary tumor)である。特定の態様では、治療される膵臓癌は腺癌である。特定の態様では、治療される膵臓癌は神経内分泌腫瘍である。特定の態様では、膵神経内分泌腫瘍は、ガストリノーマ、グルカゴノーマ、インスリノーマ、非機能性膵島細胞腫瘍、ビポーマ(VIPoma)、またはソマトスタチノーマである。特定の態様では、治療される膵臓癌は、神経内分泌腫瘍ではない。

#### 【0118】

特定の態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)により治療される膵臓癌は、切除可能な腫瘍、局所進行性の癌または転移性の膵臓癌である。特定の態様では、膵臓癌はAJCC TNMシステムに従って判定してグレード1、2、3または4の癌である。10

#### 【0119】

一態様において、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、何らかの治療形態をすでに受けている膵臓癌患者を治療するのに特に有用である。別の態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、以前に癌治療に失敗した膵臓癌患者を治療するために使用される。失敗した癌治療は、限定するものではないが、化学療法、アジュvant療法、ネオアジュvant療法、およびこれらの組み合わせを含み得る。一態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、化学療法抵抗性の腫瘍を治療するために使用される。別の態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、化学療法抵抗性の膵臓癌を治療するために使用される。20

#### 【0120】

一態様では、治療方法は、最初に、患者由来の膵臓癌細胞を含む生物学的サンプルを試験して、それらがNOTCH3遺伝子を所定の基準以上に、例えば膵臓癌におけるNOTCH3発現レベルの中央値以上に、発現するかどうかを判定する段階を含む。そのサンプルが上昇したNOTCH3発現レベルを示す患者は、その後、NOTCH受容体の活性を妨害するNOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)を用いて治療される。投与される用量は、治療すべき特定の症状、投与経路、および当技術分野で周知の臨床上の検討事項に依存するだろう。投与量は、有益な効果、例えば腫瘍増殖の減速、が検出されるまで、徐々に増やすことができる。NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、単一または多重投薬計画で提供することができ、かつ単独でまたは他の治療剤と組み合わせて与えることができる。30

#### 【0121】

NOTCH3発現が増加している膵臓癌の治療は、どのような投与経路および剤形とも適合する。治療される特定の症状に応じて、ある種の剤形は、他のものよりも便利である、または有効である傾向がある。例えば、NOTCH阻害剤は非経口的に、局所的に、経口的に、口から、内服的に、鼻腔内に、直腸に、腫に、舌側に、および経皮的に投与することができる。特定の剤形には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、エアロゾル剤、坐剤、皮膚用パッチ、非経口および経口液剤、例えば懸濁液剤、溶液剤および乳濁液剤などが含まれる。徐放性の剤形を使用することも可能である。全ての剤形は、当技術分野で標準的な方法(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Easton, Pa. (1980)参照)を用いて調製することができる。40

#### 【0122】

特定の態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)の投与は、静脈注射により、または静脈内に行うことができる。ある態様では、投与は静脈内注入によるものである。ある態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)の投与は、非静脈内経路によるものでもよい。

#### 【0123】

NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)治療剤の適切な投与量は、疾患の重症度および経過、疾患の応答性、抗体またはNOTCH阻害剤が治療目的で、それとも予防目的で投与されるのか、以前の治療法、患者の病歴などに依存しており、全てが医師の裁量に任される。抗体または他のNOTCH阻害剤は、1回だけ、または数日から数ヶ月間続く一連の治療にわたって、または治癒がもたらされるまで、または病状の減退(例えば、腫瘍サイズの縮小)が達成されるまで、投与することができる。最適な投薬スケジュールは、患者の体内の薬物蓄積50

の測定から計算することができ、個々の抗体または他のNOTCH阻害剤の相対的効力に依存して変化する。投与する医師は、最適な投与量、投与方法、および繰り返し率を容易に決定することができる。一般的に、抗NOTCH抗体(例えば、OMP-59R5)の投与量は、体重kgあたり $0.01\text{ }\mu\text{g} \sim 100\text{mg}$ であり、1日に、週に、月に、または年に1回または複数回与えることができる。治療する医師は、測定された滞留時間および体液または組織中の抗体もしくは作用剤の濃度に基づいて、投与のための繰り返し率を推定することができる。

#### 【0124】

当業者には知られているように、使用する用量は、達成すべき臨床目標に応じて変化する。ある態様では、抗NOTCH抗体(例えば、OMP-59R5)の各用量は、約 $0.25\text{mg/kg} \sim 15\text{mg/kg}$ である。ある態様では、各用量は約 $0.25$ 、 $0.5$ 、 $1$ 、 $2$ 、 $3$ 、 $4$ 、 $5$ 、 $6$ 、 $7$ 、 $8$ 、 $9$ 、 $10$ 、 $11$ 、 $12$ 、 $13$ 、 $14$ 、 $15$ 、 $16$ 、 $17$ 、 $18$ 、または $19\text{mg/kg}$ である。特定の態様では、各用量は約 $0.5\text{mg/kg}$ である。特定の態様では、各用量は約 $1\text{mg/kg}$ である。特定の態様では、各用量は約 $2.5\text{mg/kg}$ である。特定の態様では、各用量は約 $5\text{mg/kg}$ である。特定の態様では、各用量は約 $7.5\text{mg/kg}$ である。特定の態様では、各用量は約 $10\text{mg/kg}$ である。特定の態様では、各用量は約 $12.5\text{mg/kg}$ である。特定の態様では、各用量は約 $15\text{mg/kg}$ である。

#### 【0125】

特定の態様では、本明細書に記載の方法において使用されるNOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、間欠的投薬計画を用いて患者に投与されるが、この間欠的投薬計画は、ある場合には、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)の投与に関連した副作用および/または毒性を軽減しうる。本明細書で使用される「間欠的投薬」とは、週に2回以上の投与間隔を用いる投薬計画、例えば、2週間にごとに1回、3週間にごとに1回、4週間にごとに1回の投与などを指す。ある態様では、ヒト患者における膵臓癌の治療方法は、患者に、有効な用量のNOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)を間欠的投薬計画に従って投与する段階を含む。ある態様では、ヒト患者における膵臓癌の治療方法は、患者に、有効な用量のNOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)を間欠的投薬計画に従って投与して、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)の治療指数を高める段階を含む。ある態様では、間欠的投薬計画は、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)の初回用量を患者に投与し、さらにNOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)のその後の用量を2週間に約1回投与する段階を含む。ある態様では、間欠的投薬計画は、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)の初回用量を患者に投与し、さらにNOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)のその後の用量を3週間に約1回投与する段階を含む。ある態様では、間欠的投薬計画は、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)の初回用量を患者に投与し、さらにNOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)のその後の用量を4週間に約1回投与する段階を含む。

#### 【0126】

いくつかの代替的態様では、本方法で使用される抗NOTCH抗体は、OMP-59R5、またはOMP-59R5の6つのCDRおよび/または可変領域を含む抗体であり、抗体は、対象に、約 $2.5\text{mg/kg} \sim 7.5\text{mg/kg}$ (例えば、約 $2.5\text{mg/kg}$ 、約 $5\text{mg/kg}$ 、または約 $7.5\text{mg/kg}$ )の投与量で約2~3週間にごとに静脈内投与される。

#### 【0127】

特定の態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)を投与する段階に加えて、方法または治療は、少なくとも1種の追加の治療剤または治療法を施すことをさらに含む。追加の治療剤または治療法は、抗NOTCH治療剤の投与前、投与と同時、および/または投与後に施すことができる。ある態様では、少なくとも1種の追加の治療剤または治療法は、1種、2種、3種、またはそれ以上の追加の治療剤または治療法を含む。

#### 【0128】

少なくとも2種の治療剤を用いる併用療法は、異なる作用機序で機能する薬剤を使用することが多いが、これは必須ではない。作用機序の異なる薬剤を用いる併用療法は、相加または相乗効果をもたらす可能性がある。併用療法は、各薬剤の用量を、単剤療法で使用するよりも、低くすることが可能であり、それによって有害な副作用を低減することができる。併用療法では、薬剤耐性の癌細胞を発生させる可能性が低くなるかもしれない。

10

20

30

40

50

## 【0129】

NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)と追加の治療剤または治療法の組み合わせは、任意の順序でまたは並行して同時に施すことができる事が理解されよう。ある態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、第2の治療剤薬または治療法による治療を以前に受けたことがある患者に投与される。特定の他の態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)と第2の治療剤または治療法は、ほぼ同時にまたは並行して同時に投与される。例えば、対象は、第2の治療剤による治療(例えば化学療法)を受けている間に、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)を投与され得る。特定の態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、第2の治療剤を用いて治療してから1年以内に投与される。特定の別の態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、第2の治療剤を用いて治療してから10、8、6、4または2ヶ月以内に投与される。特定の他の態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、第2の治療剤を用いて治療してから4、3、2、または1週間以内に投与される。ある態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は、第2の治療剤を用いて治療してから5、4、3、2、または1日以内に投与される。これら2種(もしくはそれ以上)の薬剤または治療は、数時間以内または数分以内に(すなわち、ほぼ同時に)対象に投与され得ることがさらに理解されよう。

10

## 【0130】

当業者には知られているように、使用する用量は、達成すべき臨床目標に応じて変化する。ある態様では、抗NOTCH抗体(例えば、OMP-59R5)の各用量は、約0.25mg/kg～約15mg/kgである。ある態様では、各用量は約0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20mg/kgである。特定の態様では、各用量は約0.5mg/kgである。特定の態様では、各用量は約1mg/kgである。特定の態様では、各用量は約2.5mg/kgである。特定の態様では、各用量は約5mg/kgである。特定の態様では、各用量は約7.5mg/kgである。特定の態様では、各用量は約10mg/kgである。特定の態様では、各用量は約12.5mg/kgである。特定の態様では、各用量は約15mg/kgである。

20

## 【0131】

特定の態様では、本明細書に記載される膵臓癌の治療方法は、1種または複数種の化学療法剤と組み合わせたNOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)の投与を含む。したがって、ある態様では、この方法または治療は、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)と化学療法剤または複数の異なる化学療法剤のカクテルとの併用投与を含む。特定の態様では、本明細書に記載の方法は、膵臓癌患者に、治療上有効量のOMP-59R5抗体を、ゲムシタビンおよびアブラキサン(商標)(タンパク質結合パクリタキセル)と組み合わせて投与する段階を含む。NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)による治療は、化学療法剤の投与前、投与と同時、または投与後に行うことができる。併用投与は、単一の医薬製剤もしくは別個の製剤を用いる同時投与、またはいずれかの順序での、しかし一般的には全ての活性薬剤がその生物学的活性を同時に発揮することができるような時間内での、連続投与を含むことができる。このような化学療法剤の調合および投薬スケジュールは、メーカーの使用説明書に従って、または当業者が経験的に決定するように、使用され得る。このような化学療法の調合および投薬スケジュールはまた、Chemotherapy Service, 編者M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)に記載されている。

30

## 【0132】

本発明において有用な化学療法剤としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：アルキル化剤、例えばチオテパおよびシクロホスファミド；スルホン酸アルキル類、例えばブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファン；アジリジン類、例えばベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、およびウレドーパ(uredopa)；エチレンイミン類およびメチルメラミン類、例えばアルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミドおよびトリメチロールメラミン；ナイトロジエンマスター、例えばクロラムブシリ、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノブエンビキン(novembichin)、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスター；ニトロソ尿素類、例え

40

50

ばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン；抗生物質、例えばアクラシノマイシン類、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン(carabacin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトイマイシン類、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン類、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；代謝拮抗剤、例えばメトトレキサートおよび5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸類似体、例えばデノブテリン、メトトレキサート、ブテロブテリン、トリメトレキサート；プリン類似体、例えばフルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミブリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えばアンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフルール、シトシンアラビノシド、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FU；アンドロゲン、例えばカルステロン、プロピオニ酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充薬、例えばホリニン酸；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシル(bestrabucil)；ビサントレン；エダトレキサート；デホファミン(defofamine)；デメコルチン；ジアジクオン；エフロルニチン；酢酸エリフチニウム(elliptinium acetate)；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK；ラゾキサン；シゾフラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2,2'-,2"-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(Ara-C)；タキソイド類、例えばパクリタキセルおよびドセタキセル；クロラムブシル；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；白金類似体、例えばシスプラチニンおよびカルボプラチニン；ビンプラスチニン；白金；エトポシド；イホスファミド；マイトイマイシンC；ミトキサントロン；ビンクリスチニン；ビノレルビン；ナベルビン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノブテリン；ゼローダ；イバンドロネット；CPT11；トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン；レチノイン酸；エスペラミシン類；カペシタビン；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体。また、化学療法剤には、腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤も含まれ、抗エストロゲン剤、例えばタモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害性4(5)-イミダゾール類、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン(keoxifene)、LY117018、オナプリストン、およびトレミフェン(フェアストン)；抗アンドロゲン剤、例えばフルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリン；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が挙げられる。

## 【0133】

特定の態様では、化学療法剤はトポイソメラーゼ阻害剤である。トポイソメラーゼ阻害剤は、トポイソメラーゼ酵素(例えば、トポイソメラーゼIまたはII)の作用を妨害する化学療法剤である。トポイソメラーゼ阻害剤としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：ドキソルビシンHCl、ダウノルビシンクエン酸塩、ミトキサントロンHCl、アクチノマイシンD、エトポシド、トポテカンHCl、テニポシド、およびイリノテカン、ならびにこれらのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体。

## 【0134】

特定の態様では、化学療法剤は代謝拮抗剤である。代謝拮抗剤は、正常な生化学反応に必要な代謝産物に類似する構造を有するが、細胞の1つまたは複数の正常な機能、例えば

10

20

30

40

50

細胞分裂を妨害するのに十分に異なる構造を有する化学物質である。代謝拮抗剤としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：ゲムシタビン、フルオロウラシル、カペシタビン、メトトレキサートナトリウム、ラルチトレキセド、ペメトレキセド、テガフル、シトシンアラビノシド、チオグアニン、5-アザシチジン、6-メルカプトブリン、アザチオプリン、6-チオグアニン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、およびクラドリビン、ならびにこれらのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体。特定の態様では、本明細書に記載の方法は、膵臓癌患者に、治療上有効量のOMP-59R5抗体を代謝拮抗剤と組み合わせて投与する段階を含む。特定の態様では、代謝拮抗剤はヌクレオシド類似体である。特定の態様では、本明細書に記載の方法は、膵臓癌患者に、治療上有効量のOMP-59R5抗体をゲムシタビンと組み合わせて投与する段階を含む。

10

### 【0135】

特定の態様では、化学療法剤は抗有糸分裂剤であり、例えば、チューブリンに結合する薬剤を含むが、これに限定されるものではない。ある態様では、この薬剤はタキサンである。特定の態様では、薬剤は、パクリタキセルもしくはドセタキセル、またはパクリタキセルもしくはドセタキセルの薬学的に許容される塩、酸、もしくは誘導体である。特定の別の態様では、抗有糸分裂剤はビンカアルカロイド、例えば、ビンクリスチン、ビンプラスチン、ビノレルビン、もしくはビンデシン、またはその薬学的に許容される塩、酸、もしくは誘導体を含む。特定の態様では、本明細書に記載の方法は、膵臓癌患者に、治療上有効量のOMP-59R5抗体を抗有糸分裂剤と組み合わせて投与する段階を含む。特定の態様では、代謝拮抗剤はタキサンである。特定の態様では、本明細書に記載の方法は、膵臓癌患者に、治療上有効量のOMP-59R5抗体をアブラキサン(商標)(タンパク質結合パクリタキセル)と組み合わせて投与する段階を含む。

20

### 【0136】

特定の態様において、治療は、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)と放射線療法の併用投与を含む。NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)による治療は、放射線療法の投与前、投与と同時、または投与後に行うことができる。このような放射線療法のための投与スケジュールは、熟練した医師によって決定され得る。ある態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は放射線治療後に投与される。ある態様では、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)は放射線療法と共に投与される。

30

### 【0137】

いくつかの態様では、第2の治療剤は抗体を含む。こうして、治療は、抗NOTCH抗体(例えば、OMP-59R5)または他のNOTCH阻害剤と、追加の腫瘍関連抗原に対する他の抗体、例えば、限定するものではないが、EGFR、ErbB2、DLL4もしくはNF- $\kappa$ Bに結合する抗体、との併用投与を含むことができる。例示的な抗DLL4抗体は、例えば、米国特許第7,750,124号に記載されている。追加の抗DLL4抗体は、例えば、国際特許出願公開番号WO 2008/091222およびWO 2008/0793326、ならびに米国特許出願公開第2008/0014196号；第2008/0175847号；第2008/0181899号；および第2008/0107648号に記載されている。併用投与は、単一の医薬製剤もしくは別個の製剤を用いる同時投与、またはいずれかの順序での、しかし一般的には全ての活性薬剤がその生物学的活性を同時に発揮することができるような時間内の、連続投与を含むことができる。

40

### 【0138】

さらに、NOTCH阻害剤(例えば、OMP-59R5)による治療は、1種または複数種のサイトカイン(例えば、リンホカイン、インターロイキン、腫瘍壞死因子、および/または成長因子)との併用治療を含むことができ、あるいは腫瘍、癌細胞の外科的切除または治療する医師が必要と認めた他の任意の治療法を伴うことができる。

### 【0139】

#### 5. 抗体およびその作製

本発明の方法において有用な追加の抗体は、当技術分野で知られている任意の適切な方法によって作製することができる。ポリクローナル抗体は公知の方法によって調製され得る。ポリクローナル抗体は、関連する抗原(精製されたペプチド断片、全長の組換えタン

50

パク質、融合タンパク質など)を皮下または腹腔内に複数回注射することで動物(例えば、ウサギ、ラット、マウス、ロバなど)を免疫することによって引き出される。この関連抗原は、安定したエマルジョンを形成するために、任意で、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、血清アルブミンなどにコンジュゲート化され、滅菌生理食塩水で希釈され、アジュvant(例えば、完全または不完全フロイントアジュvant)と組み合わされたものである。その後、ポリクローナル抗体は、そのように免疫した動物の血液、腹水などから回収される。採取された血液は凝固させ、血清をデカントし、遠心分離によって清澄化して、抗体力値についてアッセイされる。ポリクローナル抗体は、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析などを含む、当技術分野で標準的な方法に従って、血清または腹水から精製することができる。

10

#### 【0140】

モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495に記載されるようなハイブリドーマ法を用いて調製することができる。ハイブリドーマ法を用いて、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物を上述したように免疫して、免疫抗原に特異的に結合する抗体のリンパ球による産生を引き出す。リンパ球をインビトロで免疫することも可能である。免疫後、リンパ球を分離し、例えばポリエチレングリコールを用いて、適切なミエローマ細胞株と融合させてハイブリドーマ細胞を形成させ、その後ハイブリドーマ細胞を未融合のリンパ球およびミエローマ細胞から選別することができる。免疫沈降、イムノプロッティング、またはインビトロ結合アッセイ(例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA); 酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA))で測定して、所定の抗原に対して特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、次いで、標準的な方法(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986)を用いるインビトロ培養で、または動物内の腹水腫瘍としてインビボで、増殖させることができる。モノクローナル抗体はその後、ポリクローナル抗体について上述したように、培養培地または腹水から精製することができる。

20

#### 【0141】

あるいは、モノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567号に記載されるような組換えDNA法を用いて作製することもできる。モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを、成熟B細胞またはハイブリドーマ細胞から、例えば抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を特異的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマーを用いたRT-PCRによって単離し、それらの配列を従来の手法により決定する。次に、重鎖と軽鎖をコードする単離されたポリヌクレオチドを適切な発現ベクターにクローニングし、ベクターを大腸菌(*E. coli*)細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、またはミエローマ細胞などの宿主細胞にトランスフェクトすると、モノクローナル抗体が宿主細胞によって生成される。また、所望の種の組換えモノクローナル抗体またはその断片は、所望の種のCDRを発現するファージディスプレイライブラリーから、記載のように単離することができる(McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554; Clackson et al., 1991, Nature, 352:624-628; およびMarks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597)。

30

#### 【0142】

モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドは、別の抗体を作製するために、組換えDNA技術を用いる多くの異なる方法でさらに修飾することができる。ある態様では、例えばマウスモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖の定常ドメインは、1)キメラ抗体を作製するために、例えばヒト抗体のこれらの領域に代えて、または2)融合抗体を作製するために非免疫グロブリンポリペプチドに代えて、使用することができる。ある態様では、定常領域は、モノクローナル抗体の所望の抗体断片を作製するために、トランケートされるか、または取り除かれる。可変領域の部位特異的変異誘発または高密度変異誘発は、モノクローナル抗体の特異性、親和性などを最適化するために使用することができる。

40

#### 【0143】

いくつかの態様では、本発明の方法において有用なモノクローナル抗体は、ヒト化抗体である。特定の態様では、このような抗体は、ヒト対象に投与したときの抗原性およびHA

50

MA(ヒト抗マウス抗体)応答を低減するために治療上使用される。ヒト化抗体は、当技術分野で公知のさまざまな技術を用いて作製することができる。特定の別の態様では、本発明の方法において有用な抗体は、ヒト抗体である。

#### 【0144】

ヒト抗体は、当技術分野で公知のさまざまな技術を用いて直接調製することができる。標的抗原に対する抗体を産生する、インビトロで免疫されたまたは免疫個体から単離された不死化ヒトBリンパ球を得ることが可能である(例えば、Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 1991, J. Immunol. 147(1):86-95; および米国特許第5,750,373号を参照されたい)。また、ヒト抗体はファージライブラリーから選択することができ、ファージライブラリーは、例えば以下に記載されるように、ヒト抗体を発現する(Vaughan et al., 1996, Nat. Biotech., 14:309-314; Sheets et al., 1998, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; およびMarks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581)。抗体ファージライブラリーを作製して使用するための技術もまた、米国特許第5,969,108号、第6,172,197号、第5,885,793号、第6,521,404号、第6,544,731号、第6,555,313号、第6,582,915号、第6,593,081号、第6,300,064号、第6,653,068号、第6,706,484号、および第7,264,963号; ならびにRothe et al., 2007, J. Mol. Biol., doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018(これらの各々はその全体が参照により組み入れられる)に記載されている。親和性成熟戦略およびチェーンシャッフリング戦略(Marks et al., 1992, Biotechnology 10:779-783; その全体が参照により組み入れられる)は、当技術分野で公知であり、高親和性のヒト抗体を作製するために使用することができる。  
10  
20

#### 【0145】

ヒト化抗体はまた、免疫したときに内因性免疫グロブリン産生の不在下でヒト抗体の全レパートリーを産生することが可能な、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むトランスジェニックマウスにおいて作製することができる。このアプローチは、米国特許第5,545,807号、第5,545,806号、第5,569,825号、第5,625,126号、第5,633,425号、および第5,661,016号に記載されている。

#### 【0146】

特定の態様では、本発明の方法において有用な抗体は、ヒトNOTCH受容体を特異的に認識する二重特異性抗体である。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープを特異的に認識して結合することができる抗体である。異なるエピトープは、同じ分子(例えば、同じヒトNOTCH受容体)内にあっても、異なる分子上にあってもよい。二重特異性抗体はインタクトな抗体または抗体断片であり得る。  
30

#### 【0147】

あるいは、特定の別の態様では、本発明に有用な抗体は、二重特異性抗体ではない。

#### 【0148】

特定の態様では、本発明に有用な抗体は单一特異性である。例えば、抗体に含まれる1つまたは複数の抗原結合部位の各々は、同じヒトNOTCH受容体に結合することができる(または結合する)。特定の態様では、单一特異性抗体の抗原結合部位は、1、2、3、または4つのヒトNOTCH受容体に結合することができる(または結合する)。  
40

#### 【0149】

特定の態様では、本発明の方法に有用な抗体は抗体断片である。抗体断片は完全な抗体と比べて増加した腫瘍浸透を示すことができる。抗体断片を作製するためのさまざまな技術が知られている。伝統的には、これらの断片はインタクト抗体のタンパク質分解消化により誘導される(例えば、Morimoto et al., 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; Brennan et al., 1985, Science, 229:81)。特定の態様では、抗体断片は組換え的に作製される。Fab、Fv、およびscFv抗体断片は全て、大腸菌または他の宿主細胞内で発現させて、細胞から分泌させることができ、したがって、これらの断片の大量生産が可能である。このような抗体断片はまた、上述した抗体ファージライブラリーから単離することもできる。抗体断片はまた、例えば米国特許第5,641,870号に記

載されるような、直鎖状抗体とすることができる、単一特異性または二重特異性であり得る。本発明の方法において有用な单鎖抗体は、例えば米国特許第4,946,778号に記載されるように、調製することができる。また、Fab発現ライブラリーを構築するための方法(Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989))は、NOTCH受容体に対して所望の特異性を有するモノクローナルFab断片の迅速かつ有効な同定を可能にするように適合させることができる。抗体断片は、以下を含むがこれらに限定されない当技術分野における技法によって作製することができる：(a)  $F(ab')_2$ 断片は、抗体分子のペプシン消化により作製される；(b) Fab断片は、 $F(ab')_2$ 断片のジスルフィド架橋を還元することによって作製される；(c) Fab断片は、抗体分子をパパインおよび還元剤で処理することによって作製される；および(d) Fv断片。抗体断片を作製するための他の技法は、当業者には明らかであろう。

10

## 【0150】

さらに、血清半減期を増加させるために抗体を修飾することが、特に抗体断片の場合に、望ましいことがある。これは、例えば、抗体断片の適切な領域の突然変異により抗体断片にサルベージ受容体結合エピトープを組み込むことによって、またはペプチドタグにエピトープを組み込み、次いで抗体断片にどちらかの末端部または中間部で(例えば、DNAもしくはペプチド合成により)融合させることによって、達成することができる。

## 【0151】

特定の態様では、本発明の方法に有用な抗体は、ヘテロコンジュゲート抗体である。ヘテロコンジュゲート抗体は、2種の共有結合した抗体で構成される。こうした抗体は、例えば、不要な細胞に対して免疫細胞を標的化するために提案してきた(米国特許第4,676,980号)。抗体は、架橋剤を使用する方法を含めて、合成タンパク質化学における公知の方法を用いて、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を使用して、またはチオエーテル結合を形成することによって、構築することができる。この目的に適した試薬の例としては、イミノチオラートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミダートが挙げられる。

20

## 【0152】

定常Fc領域はいくつかのエフェクター機能を媒介することが当技術分野で知られている。例えば、抗体への補体成分C1の結合は、補体系を活性化する。補体の活性化は、細胞病原体のオプソニン化および溶解において重要である。補体の活性化はまた、炎症反応を刺激し、また、自己免疫過敏性にも関与することがある。さらに、抗体または可溶性受容体はFc領域を介して細胞に結合できるが、その際、抗体Fc領域のFc受容体部位は細胞上のFc受容体(FcR)に結合する。IgG(受容体)、IgE(受容体)、IgA(受容体)およびIgM(μ受容体)を含めて、抗体の異なるクラスに特異的なFc受容体が、いくつか存在する。細胞表面上のFc受容体への抗体の結合は、以下を含めて、多くの重要かつ多様な生物学的応答を惹起させる：抗体被覆粒子の飲み込みおよび破壊、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による抗体被覆標的細胞の溶解(抗体依存性細胞媒介性細胞傷害、またはADCCと呼ばれる)、炎症性メディエーターの放出、胎盤通過、ならびに免疫グロブリン産生の制御。

30

## 【0153】

特定の態様では、本発明の方法に有用なNOTCHアンタゴニストポリペプチド(抗体およびFcを含む可溶性受容体)は、改変されたエフェクター機能を提供し、ひいては、投与されたポリペプチドの生物学的プロファイルに影響を与える。例えば、定常領域ドメインの欠失または不活性化(点変異または他の手段による)は、循環している修飾抗体のFc受容体結合を減少させ、それによって腫瘍局在化を増加させることができる。他の例では、定常領域の修飾が補体結合を抑え、そのためにコンジュゲート化細胞毒素の血清半減期および非特異的結合を減少させるかもしれない。定常領域のさらに他の修飾を用いて、ジスルフィド結合またはオリゴ糖部分を除去することができ、こうした修飾は、抗原特異性または抗体柔軟性を増大させるため、増強された局在化を可能にする。同様に、定常領域に対する修飾は、十分に当業者の技量の範囲内にある周知の生化学的または分子工学的技術を用いて容易に行うことができる。

40

## 【0154】

50

特定の態様では、本発明の方法に有用なFc領域を含むNOTCHアンタゴニストポリペプチド(抗体およびFcを含む可溶性受容体)は、エフェクター機能を1つも有していない。例えば、ある態様では、ポリペプチドは抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性および/または補体依存性細胞傷害(CDC)活性を一切有しない。特定の態様では、ポリペプチドはFc受容体および/または補体因子に結合しない。特定の態様では、抗体にはエフェクター機能がない。

#### 【0155】

本発明はまた、細胞毒性剤にコンジュゲート化されたNOTCHアンタゴニストポリペプチド(例えば、抗NOTCH抗体)を含むイムノコンジュゲートの使用に関する。細胞毒性剤には、化学療法剤、増殖阻止剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素、またはその断片)、放射性同位体(すなわち、放射性コンジュゲート)などが含まれる。このようなイムノコンジュゲートの作製に有用な化学療法剤には、例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシリ、ダウノルビシンまたは他の挿入剤が含まれる。使用できる酵素的に活性な毒素およびその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、サルシン、シナアブラギリ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ(*Phytolaca americana*)タンパク質(PAPI、PAPIIおよびPAP-S)、ニガウリ(*momordica charantia*)阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ(*sapaponaria officinalis*)阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン(*phenomycin*)、エノマイシン(*enomycin*)、およびトリコセン類が含まれる。種々の放射性核種は、<sup>212</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>131</sup>In、<sup>90</sup>Y、および<sup>186</sup>Reを含めて、放射性コンジュゲート化抗体の作製のために利用可能である。抗体と細胞毒性剤とのコンジュゲートは、以下のような種々の二官能性タンパク質カップリング剤を用いて作製される:N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(例えば、アジトイミド酸ジメチルHCl)、活性エステル(例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド(例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン2,6-ジイソシアネート)、およびビス-活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)。抗体と、1つまたは複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、トリコセン(*trichothene*)およびCC1065、ならびに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体、とのコンジュゲートを使用することもできる。

#### 【0156】

コンジュゲート抗体は、2つの共有結合した抗体で構成される。こうした抗体は、例えば、不要な細胞に対して免疫細胞を標的化するために提案されている(米国特許第4,676,980号)。抗体は、架橋剤を使用する方法を含めて、合成タンパク質化学における公知の方法を用いて、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を使用して、またはチオエーテル結合を形成することによって、構築することができる。この目的に適した試薬の例としては、イミノチオラートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミダートが挙げられる。

#### 【0157】

有用な量がどのように得られるかにかかわらず、本発明の方法において有用なNOTCHアンタゴニストポリペプチド(例えば、抗体および可溶性受容体)は、多くのコンジュゲート化形態(すなわち、イムノコンジュゲート)または非コンジュゲート化形態のいずれかで使用され得る。あるいは、ポリペプチドは非コンジュゲート化形態、つまり「裸の」形態で使用され得る。特定の態様では、ポリペプチドは、補体依存性細胞傷害作用(CDC)および抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)を含む対象の自然の防御機構を利用して悪性細胞を排除するために、非コンジュゲート化形態で使用される。ある態様では、ポリペプチドは、多数の周知のキレート剤のいずれかまたは直接ラベリングを使用して、放射性同位体、例えば<sup>90</sup>Y、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>123</sup>I、<sup>111</sup>In、<sup>105</sup>Rh、<sup>153</sup>Sm、<sup>67</sup>Cu、<sup>67</sup>Ga、<sup>166</sup>Ho、<sup>177</sup>Lu、<sup>186</sup>Reおよ

10

20

30

40

50

び<sup>188</sup>Reにコンジュゲート化することができる。他の態様では、本組成物は、薬物、プロドラッグ、または生体応答調節剤にカップリングされた、例えばメトトレキサート、アドリアマイシン、およびインターフェロンなどのリンホカインにカップリングされた、NOTCHアンタゴニストポリペプチドを含むことができる。さらに他の態様は、リシンまたはジフテリア毒素などの特定の生物毒素にコンジュゲート化されたNOTCHアンタゴニストポリペプチドの使用を含む。さらに他の態様では、NOTCHアンタゴニストポリペプチドは、他の免疫学的に活性なりガンド(例えば、抗体またはその断片)との複合体を形成することができ、その場合に、結果として得られる分子は、腫瘍細胞とT細胞などのエフェクター細胞の両方に結合する。コンジュゲート化または非コンジュゲート化NOTCHアンタゴニストポリペプチドのどちらを使用するかの選択は、神経内分泌腫瘍のタイプおよびステージ、補助治療(例えば、化学療法または外部放射線)の使用、ならびに患者の状態に依存するであろう。当然、当業者は本明細書の教示を考慮してこのような選択を容易に行うことができる。

10

## 【0158】

ポリペプチドおよび類似体は、通常そのタンパク質の一部ではない追加の化学的部分を含むように、さらに修飾することができる。これらの誘導体化された部分は、溶解性、生物学的半減期またはタンパク質の吸収を向上させることができる。また、これらの部分は、タンパク質の望ましくない副作用などを軽減または排除することができる。これらの部分についての概要は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000)に見出すことができる。

20

## 【0159】

誘導体化に最も適した化学的部分には、水溶性のポリマーが含まれる。水溶性ポリマーは、それに結合されたタンパク質が生理的環境などの水性環境において沈殿しないという理由で、望ましい。ある態様では、ポリマーは、治療用の製品または組成物の調製のために薬学的に許容されるものである。当業者は、以下のような考慮事項に基づいて、所望のポリマーを選択することができる：ポリマー-タンパク質コンジュゲートが治療的に使用されるかどうか、そうだとしたら、所望の投与量、循環時間、タンパク質分解に対する抵抗性、および他の検討事項。誘導体化の有効性は、その誘導体を所望の形態で(すなわち、浸透圧ポンプにより、または注射もしくは注入により、または経口、肺もしくは他の送達経路用にさらに製剤化して)投与し、その有効性を判定することによって確認することができる。適切な水溶性ポリマーとしては、限定するものではないが、以下が挙げられる：ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか)、デキストラン、ポリ(n-ビニルピロリドン)-ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、プロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、およびこれらの混合物。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のため、製造する上で有利なことがある。

30

## 【0160】

本発明の方法において有用な単離されたポリペプチド(例えば、抗体および可溶性受容体)は、当技術分野で知られた任意の適切な方法によって作製することができる。このような方法は、直接タンパク質合成法から、単離されたポリペプチド配列をコードするDNA配列を構築して、これらの配列を適切な形質転換宿主において発現させる方法にまで及ぶ。ある態様では、DNA配列は、対象となる野生型タンパク質をコードするDNA配列を単離または合成することにより、組換え技術を用いて構築される。任意で、配列は、その機能的類似体を提供するために、部位特異的変異誘発によって変異を起こさせてよい。例えば、Zoeller et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5662-5066 (1984)および米国特許第4,588,585号を参照されたい。

40

50

**【 0 1 6 1 】**

いくつかの態様では、対象となるポリペプチドをコードするDNA配列は、オリゴヌクレオチド合成機を用いて化学合成によって構築される。そのようなオリゴヌクレオチドは、所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて、かつ対象となる組換えポリペプチドが产生されることになる宿主細胞において好まれるコドンを選択して、設計することができる。標準的な方法を適用して、対象となる単離されたポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド配列を合成することができる。例えば、完全なアミノ酸配列を使用して、逆翻訳された遺伝子を構築することが可能である。さらに、特定の単離されたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むDNAオリゴマーを合成することができる。例えば、所望のポリペプチドの部分をコードする幾つかの小さなオリゴヌクレオチドを合成し、その後ライゲーションすることができる。個々のオリゴヌクレオチドは、典型的には、相補的アセンブリのための5'または3'オーバーハングを含む。

10

**【 0 1 6 2 】**

対象となる特定の単離されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、(合成、部位特異的変異誘発または他の方法により)アセンブルされたら、発現ベクターに挿入され、所望の宿主中でのタンパク質の発現に適切な発現制御配列に機能的に連結される。適切なアセンブリは、ヌクレオチド配列決定、制限酵素マッピング、および適切な宿主中での生物学的に活性なポリペプチドの発現により確認することができる。当技術分野では周知であるように、トランスフェクトされた遺伝子の宿主内での高発現レベルを得るために、その遺伝子は、所定の発現宿主において機能的である転写・翻訳発現制御配列に機能的に連結される必要がある。

20

**【 0 1 6 3 】**

特定の態様では、NOTCHアンタゴニストポリペプチド(例えば、抗体または可溶性受容体)を増幅しかつ発現させるために、組換え発現ベクターが使用される。組換え発現ベクターは、哺乳動物、微生物、ウイルスまたは昆虫の遺伝子に由来する適切な転写または翻訳調節エレメントに機能的に連結された、対象となるポリペプチドをコードする合成またはcDNA由来のDNA断片を含む複製可能なDNA構築物である。転写単位は、一般的に、(1)遺伝子発現において調節的役割を果たす遺伝子エレメント、例えば、転写プロモーターまたはエンハンサー、(2)mRNAに転写されてタンパク質に翻訳される構造配列またはコード配列、および(3)適切な転写と翻訳の開始配列および終結配列、のアセンブリを含み、以下で詳細に説明される。このような調節エレメントは、転写を制御するオペレーター配列を含むことができる。通常は複製起点によって与えられる、宿主内で複製する能力、および形質転換体の認識を容易にする選択遺伝子をさらに組み込むことが可能である。こうしたDNA領域は、それらが互いに機能的に関連する場合に、機能的に連結されている。例えば、シグナルペプチド(分泌リーダー)のDNAは、それがポリペプチドの分泌に関する前駆体として発現される場合に、ポリペプチドのDNAに機能的に連結されている；プロモーターは、それがコード配列の転写を制御する場合に、配列に機能的に連結されている；またはリボソーム結合部位は、それが翻訳を可能にするように配置される場合に、コード配列に機能的に連結されている。酵母発現系での使用を意図した構造エレメントは、宿主細胞による翻訳タンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列を含む。あるいは、組換えタンパク質がリーダー配列または輸送配列なしで発現される場合、それはN末端メチオニン残基を含むことができる。この残基は、任意で、最終的な産物を与えるために、発現された組換えタンパク質からその後切断され得る。

30

**【 0 1 6 4 】**

発現制御配列および発現ベクターの選択は、宿主の選択に依存する。多種多様な発現宿主/ベクターの組み合わせを使用することが可能である。真核生物宿主に有用な発現ベクターには、例えば、SV40、ウシパピローマウイルス、アデノウイルスおよびサイトメガロウイルス由来の発現制御配列を含むベクターが含まれる。細菌宿主に有用な発現ベクターには、公知の細菌プラスミド、例えば、pCR1、pBR322、pMB9およびそれらの誘導体を含めた大腸菌由来のプラスミド、より広い宿主域のプラスミド、例えばM13および糸状一本鎖D

40

50

NAファージが含まれる。

#### 【0165】

NOTCHアンタゴニストポリペプチド(例えば、抗体または可溶性受容体)の発現に適した宿主細胞には、適切なプロモーターの制御下にある、原核生物、酵母、昆虫または高等真核生物の細胞が含まれる。原核生物は、グラム陰性菌またはグラム陽性菌、例えば大腸菌または桿菌を含む。高等真核生物の細胞は、後述されるような哺乳動物起源の樹立細胞株を含む。また、無細胞翻訳系を使用することもできる。細菌、真菌、酵母および哺乳動物細胞宿主と共に使用するのに適したクローニングおよび発現ベクターは、Pouwelsら(Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985)によって記載されており、その関連する開示は参照により本明細書に組み入れられる。抗体産生を含めて、タンパク質産生の方法に関するさらなる情報は、例えば、米国特許出願公開第2008/0187954号、米国特許第6,413,746号および第6,660,501号、ならびに国際特許出願公開番号WO 04009823に見出すことができ、これらの各々はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。10

#### 【0166】

種々の哺乳動物または昆虫細胞の培養系もまた、組換えタンパク質を発現させるために有利に使用される。哺乳動物細胞内の組換えタンパク質の発現は、こうしたタンパク質が一般的に正確に折りたたまれ、適切に修飾され、かつ完全に機能的であるという理由で、実施され得る。適切な哺乳動物宿主細胞株の例としては、Gluzman(Cell 23:175, 1981)により記載されるサル腎細胞のCOS-7株、および適切なベクターを発現することが可能な他の細胞株、例えば、L細胞、C127、3T3、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)、HeLaおよびBHK細胞株が挙げられる。哺乳動物発現ベクターは、非転写エレメント、例えば、複製起点、発現されるべき遺伝子に連結された適切なプロモーターおよびエンハンサー、その他の5'または3'フランкиング非転写配列、ならびに5'または3'非翻訳配列、例えば、必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終結配列を含むことができる。昆虫細胞内で異種タンパク質を産生させるためのバキュロウイルス系は、Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988)に論評されている。20

#### 【0167】

形質転換宿主により産生されたタンパク質は、任意の適切な方法に従って精製することができます。このような標準方法には、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティーやサイジングカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質精製のための他の標準的な技術が含まれる。アフィニティータグ、例えば、ヘキサヒスチジン、マルトース結合ドメイン、インフルエンザコート配列、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼは、適切なアフィニティーカラムを通過させることで容易な精製を可能にするために、タンパク質に結合させることができる。単離されたタンパク質はまた、タンパク質分解、核磁気共鳴、およびX線結晶学などの技術を用いて、物理的に特徴づけることができる。30

#### 【0168】

例えば、培地中に組換えタンパク質を分泌する系からの上清は、最初に、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmiconまたはMillipore Pellicon限外ろ過ユニットを用いて濃縮することができる。濃縮工程後、その濃縮物を適切な精製マトリックスにアプライすることができる。あるいは、アニオノン交換樹脂、例えば、ジエチルアミノエチル(DEAE)ペンドント基を有するマトリックスまたは基体を利用してよい。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロースまたはタンパク質精製に通常用いられる他の種類であり得る。あるいは、カチオン交換工程を採用してもよい。適切なカチオン交換体には、スルホプロピル基またはカルボキシメチル基を含む種々の不溶性マトリックスが含まれる。最後に、疎水性RP-HPLC媒体、例えばメチルまたは他の脂肪族ペンドント基を有するシリカゲルを用いた1つまたは複数の逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)工程を使用して、NOTCHアンタゴニストポリペプチド(例えば、抗体または可溶性受容体)をさらに精製することができる。また、前述の精製工程の一部または全部を、さまざま40

な組み合わせで使用して、均質な組換えタンパク質を得ることが可能である。

【0169】

細菌培養において産生された組換えタンパク質は、例えば、細胞ペレットからの初期抽出と、これに続く1つまたは複数の濃縮、塩析、水性イオン交換またはサイズ排除クロマトグラフィー工程により、単離することができる。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は最終精製工程に用いることができる。組換えタンパク質の発現に用いられた微生物細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含めて、任意の便利な方法で破壊することができる。

【0170】

NOTCHアンタゴニストポリペプチド(例えば、抗体または可溶性受容体)を精製するための当技術分野で知られた方法には、例えば、米国特許出願公開第2008/0312425号、第2008/0177048号、および第2009/0187005号に記載される方法も含まれ、これらの各々はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0171】

## 6. 薬学的組成物

NOTCHアンタゴニストポリペプチド(例えば、抗NOTCH抗体)は、当技術分野で公知の適切な方法によって、薬学的組成物に製剤化することができる。特定の態様では、薬学的組成物は薬学的に許容されるビヒクルを含む。薬学的組成物は、神経内分泌腫瘍の増殖を抑制し、かつヒト患者における神経内分泌腫瘍を治療する際に使用される。

【0172】

特定の態様では、製剤は、精製されたNOTCHアンタゴニスト(例えば、抗NOTCH抗体)を薬学的に許容されるビヒクル(例えば、担体、賦形剤)と組み合わせることによって、貯蔵および使用のために調製される(Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Mack Publishing, 2000)。適切な薬学的に許容されるビヒクルとしては、限定するものではないが、以下が挙げられる：無毒性の緩衝剤、例えばリン酸、クエン酸、および他の有機酸；塩類、例えば塩化ナトリウム；酸化防止剤、例えばアスコルビン酸およびメチオニン；防腐剤(例えば、塩化オクタデシルジメチルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール)；低分子量ポリペプチド(例えば、約10アミノ酸残基未満)；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリシン；炭水化物、例えば単糖類、二糖類、グルコース、マンノース、またはデキストリン；キレート剤、例えばEDTA；糖、例えばスクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール；塩形成性対イオン、例えばナトリウム；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体)；ならびに非イオン性界面活性剤、例えばTWEENまたはポリエチレングリコール(PEG)。

【0173】

特定の態様では、薬学的組成物は凍結される。特定の別の態様では、薬学的組成物は凍結乾燥される。

【0174】

本発明の薬学的組成物は、局所または全身治療のために多くの方法で投与することができる。投与は、局所(例えば、膣および直腸送達を含む粘膜への投与)、例えば経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点滴剤、坐剤、噴霧剤、液剤および粉剤；肺投与(例えば、粉末もしくはエアロゾルの吸入または送気による、例えばネブライザーによる；気管内、鼻腔内、表皮および経皮)；経口；非経口、例えば静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、筋肉内注射もしくは注入；または頭蓋内(例えば、髄腔内もしくは脳室内)投与とすることができる。

【0175】

10

20

30

40

50

治療用製剤は単位剤形とすることができます。このような製剤には、経口、非経口、もしくは直腸投与のための、または吸入による投与のための、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉剤、顆粒剤、水もしくは非水性媒体中の溶液剤または懸濁液剤、または坐剤が含まれる。錠剤などの固体組成物では、主活性成分は薬学的担体と混合される。従来の錠剤化成分は、トウモロコシデンプン、ラクトース、スクロース、ソルビトール、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、リン酸二カルシウムまたはガム、および他の希釈剤(例えば、水)を含み、本発明の化合物またはその非毒性の薬学的に許容される塩の均質な混合物を含む固体予備処方組成物を形成する。その後、固体予備処方組成物は上述したタイプの単位剤形にさらに分割される。新規な組成物の錠剤、丸剤などは、持続性作用の利点を与える剤形を提供するようにコーティングされてもよいし、またはその他の方法で調合されてもよい。例えば、錠剤または丸剤は、外側成分によって覆われた内部成分を含むことができる。さらに、これら2つの成分は腸溶層によって分離することができ、この腸溶層は崩壊に抵抗するよう作用して、内部成分が胃を無傷で通過することまたは内部成分の放出を遅らせることを可能にする。さまざまな材料がそのような腸溶層またはコーティングのために使用され、こうした材料には、多くのポリマー酸、ならびにポリマー酸とセラック、セチルアルコールおよび酢酸セルロースのような材料との混合物が含まれる。

#### 【0176】

NOTCHアンタゴニスト(例えば、抗NOTCH抗体)はまた、マイクロカプセル内に封入することができる。このようなマイクロカプセルは、例えば、コアセルベーション技術によりまたは界面重合により調製され、例えば、コロイド状薬物送達システム(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)としての、またはマクロエマルジョンとしての、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセルであり、Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)に記載される。

#### 【0177】

特定の態様では、薬学的製剤は、リポソームと複合体化されたNOTCHアンタゴニスト(例えば、抗NOTCH抗体)を含む(Epstein, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang, et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030; ならびに米国特許第4,485,045号および第4,544,545号)。循環時間を増大させたリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。一部のリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発によって生成することができる。リポソームは、所望の直径を有するリポソームを得るために規定孔径のフィルターを通して押し出される。

#### 【0178】

また、徐放性製剤を調製することが可能である。徐放性製剤の適切な例には、成形品(例えば、フィルム、またはマイクロカプセル)の形をした、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれる。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル、例えばポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸と7-エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性のエチレン-酢酸ビニル、分解性の乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT(商標)(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸ロイプロリドからなる注射用ミクロスフェア)、スクロース酢酸イソブチル、およびポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

#### 【0179】

### 7. キット

本発明の方法を実施するためのキットがさらに提供される。「キット」とは、サンプル、例えば細胞、細胞株、腫瘍、または組織におけるNOTCH3遺伝子発現のレベルを特異的に検出するための少なくとも1つの試薬、例えば核酸プローブなどを含む任意の製造品(例えば、パッケージまたは容器)を意図している。キットは、本発明の方法を実施するための

ユニットとして宣伝する、流通させる、または販売することができる。さらに、キットは、キットを説明しつつその取扱説明資料を含む添付文書を含むことができる。

【0180】

一態様では、本発明の方法を実施するためのキットが提供される。この種のキットは、手動と自動の両方のスクリーニングに適合する。qRT-PCRアッセイのために、キットは、少なくとも、NOTCH3遺伝子発現を検出するための本明細書に開示されたプローブを含む。キットはさらに、RNA抽出、逆転写、および/またはPCR増幅のための試薬類を含むことができる。特定の態様では、本発明によるキットは、SEQ ID NO:35～43からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む。

【0181】

本発明に従って使用される試薬類の活性および正しい使用法を検証するために、陽性および/または陰性対照をキットに含めることができる。対照は、NOTCH3 mRNAの存在について陽性または陰性のいずれかであることが知られているRNA調製物、ホルマリン固定組織などのサンプルを含むことができる。対照の設計および使用は一般的であり、当業者の通常の能力の範囲内である。

10

【0182】

さらに、本発明の方法の任意の段階または全段階は、人によって実施されるか、あるいは、自動化された方法で実施され得ることが理解されよう。かくして、生体サンプルの調製、サンプルの凍結もしくは固定、RNA抽出、および/またはNOTCH3転写産物レベルの検出の段階は、自動化することができる。

20

【実施例】

【0183】

本明細書に記載の実施例および態様は、単に例示を目的とするものであり、これらを踏まえたさまざまな修飾または変更は、当業者に示唆されることであり、本出願の精神および範囲に含まれるべきであることが理解されよう。

【0184】

実施例1

OMP-59R5抗NOTCH2/3受容体抗体を単剤としておよび化学療法剤と組み合わせて使用する腫瘍増殖のインビオ阻止

20,000個のOMP-PN8腫瘍細胞をNOD-SCIDマウスに注入した。腫瘍が $125\text{mm}^3$ の平均体積に達するまで、腫瘍を22日間増殖させた。腫瘍を持つマウスを、無作為に4つのグループに分けて、対照抗体、OMP-59R5(抗NOTCH2/3)、ゲムシタビン、またはOMP-59R5とゲムシタビンの組み合わせにより治療した。抗体を40mg/kgで1週間おきに投与した。ゲムシタビンは20mg/kgで週1回投与した。腫瘍体積を治療後の指定された日に測定した。OMP-59R5は、単剤として、またはゲムシタビンとの組み合わせで、OMP-PN8腫瘍の増殖を強く抑制した(図1A)。

30

【0185】

OMP-PN17脾臓腫瘍のインビオ増殖を抑制する抗NOTCH2/3 OMP-59R5抗体の能力を、実質的に同一の方法を用いて測定した。図1Bに示すように、OMP-59R5は、単剤として、またはゲムシタビンとの組み合わせで、OMP-PN17腫瘍の増殖を強く抑制した。

40

【0186】

50,000個のOMP-PN11腫瘍細胞をNOD-SCIDマウスに注入した。腫瘍が $120\text{mm}^3$ の平均体積に達するまで、腫瘍を21日間増殖させた。腫瘍を持つマウスを、無作為に4つのグループに分けて、対照抗体、OMP-59R5(抗NOTCH2/3)、ゲムシタビン、またはOMP-59R5とゲムシタビンの組み合わせにより治療した。抗体を40mg/kgで1週間おきに投与した。ゲムシタビンは20mg/kgで週1回投与した。腫瘍体積を治療後の指定された日に測定した。図1Cに示すように、OMP-59R5は、単剤としても、またはゲムシタビンとの組み合わせでも、OMP-PN11腫瘍の増殖に何の影響も及ぼさなかった。

【0187】

20,000個のUM-PE13乳房(NOTCH3高発現性)腫瘍細胞をNOD-SCIDマウスに注入した。腫瘍

50

が $140\text{mm}^3$ の平均体積に達するまで、腫瘍を37日間増殖させた。腫瘍を持つマウスを、無作為に4つのグループに分けて、対照抗体、OMP-59R5、タキソール、またはOMP-59R5とタキソールの組み合わせにより治療した。抗体は $20\text{mg/kg}$ で週1回投与した。タキソールは $10\text{mg/kg}$ で週1回投与した。腫瘍体積を治療後の指定された日に測定した。図1Dに示すように、OMP-59R5は、単剤として、またはタキソールとの組み合わせで、UM-PE13腫瘍の増殖を強く抑制した。

#### 【 0 1 8 8 】

20,000個のUM-T1乳房(NOTCH3高発現性)腫瘍細胞をNOD-SCIDマウスに注入した。腫瘍が $20\text{mm}^3$ の平均体積に達するまで、腫瘍を28日間増殖させた。腫瘍を持つマウスを、無作為に4つのグループに分けて、対照抗体、OMP-59R5抗NOTCH2/3抗体、タキソール、またはOMP-59R5とタキソールの組み合わせにより治療した。抗体は $20\text{mg/kg}$ で週1回投与した。タキソールは $10\text{mg/kg}$ で週1回投与した。腫瘍体積を治療後の指定された日に測定した。図1Eに示すように、OMP-59R5は、単剤としても、またはタキソールとの組み合わせでも、UM-T1腫瘍の増殖に何の影響も及ぼさなかった。10

#### 【 0 1 8 9 】

50,000個のOMP-Lu40肺(NOTCH3低発現性)腫瘍細胞をNOD-SCIDマウスに注入した。腫瘍が $140\text{mm}^3$ の平均体積に達するまで、腫瘍を33日間増殖させた。腫瘍を持つマウスを、無作為に4つのグループに分けて、対照抗体、OMP-59R5抗NOTCH2/3抗体、タキソール、またはOMP-59R5とタキソールの組み合わせにより治療した。抗体は $20\text{mg/kg}$ で週1回投与した。タキソールは $10\text{mg/kg}$ で週1回投与した。腫瘍体積を治療後の指定された日に測定した。図1Fに示すように、OMP-59R5は、タキソールとの組み合わせでOMP-Lu40腫瘍の増殖を強く抑制した。20

#### 【 0 1 9 0 】

50,000個のOMP-Lu53肺(NOTCH3高発現性)腫瘍細胞をNOD-SCIDマウスに注入した。腫瘍が $120\text{mm}^3$ の平均体積に達するまで、腫瘍を33日間増殖させた。腫瘍を持つマウスを、無作為に4つのグループに分けて、対照抗体、OMP-59R5抗NOTCH2/3抗体、タキソール、またはOMP-59R5とタキソールの組み合わせにより治療した。抗体は $40\text{mg/kg}$ で1週間おきに投与した。タキソールは $10\text{mg/kg}$ で週1回投与した。腫瘍体積を治療後の指定された日に測定した。図1Gに示すように、OMP-59R5は、タキソールとの組み合わせでOMP-Lu53腫瘍の増殖に何の影響も及ぼさなかった。30

#### 【 0 1 9 1 】

#### 実施例2

ゲムシタビンと組み合わせたOMP-59R5による腫瘍増殖の抑制は、膵臓腫瘍におけるNOTCH3遺伝子発現のレベルと有意に相関するが、乳房または肺の腫瘍では相関しない

NOTCH2およびNOTCH3遺伝子発現レベルは、標準的なマイクロアレイ技術を用いて、実施例1に記載のインビオ異種移植アッセイでアッセイして、膵臓、乳房および肺の腫瘍において測定した。発現データは、Affymetrix(登録商標)U133 plus 2アレイを用いて、メーカーの使用説明書に従って取得した。結果は下記の表1~3に示される。これらの表には、実施例1に記載のインビオ異種移植アッセイにおいて化学療法剤と組み合わせたOMP-59R5抗NOTCH2/3抗体を用いた治療に対する特定の腫瘍の応答性に関するデータも含まれる。表に示したNOTCH2および3遺伝子発現レベルの分析は、500のカットオフ値に基づいていた。しかし、この分析からの全体的な結論は、カットオフ値を $300\sim 1000$ の間に変化させたとき、同じままであった。NOTCH3発現とインビオ治療効果の間の相関は、乳房腫瘍および肺腫瘍サンプルにおいて観察されなかつた：高いNOTCH3遺伝子発現を有する14の乳房または肺腫瘍のうち5つの腫瘍のみが応答性であった。さらに、NOTCH2発現とインビオ効果の間の相関は、乳房、肺、または膵臓腫瘍サンプルにおいて観察されなかつた。驚くべきことに、膵臓腫瘍では、NOTCH3遺伝子発現の高レベルとOMP-59R5/ゲムシタビン治療のインビオ効果の間には非常に強い相関関係が認められた：高いNOTCH3遺伝子発現を有する10の膵臓腫瘍のうち9の腫瘍は、OMP-59R5とゲムシタビンを用いた治療に対してインビオで応答性であった。40

## 【 0 1 9 2 】

(表1) 腺臓腫瘍におけるNOTCH2およびNOTCH3遺伝子発現レベル

腫瘍	効果 (OMP-59R5 + ゲムシタビン)	N3 発現	N2 発現
PN4	+	高い (1802)	高い (4637)
PN7	-	低い (274)	高い (2140)
PN8	+	高い (2484)	高い (6909)
PN11	-	低い (141)	高い (4576)
PN13	-	低い (23)	高い (6848)
PN16	+	高い (3318)	高い (3812)
PN17	+	高い (6106)	高い (5904)
PN21	+	高い (2776)	高い (6203)
PN23	-	高い (2978)	高い (5166)
PN25	+	高い (6600)	高い (4383)

10

## 【 0 1 9 3 】

(表2) 乳房腫瘍におけるNOTCH2およびNOTCH3遺伝子発現レベル

腫瘍	効果 (OMP-59R5 + タキソール)	N3 発現	N2 発現
PE13	+	高い (5616)	高い (6283)
T1	-	高い (11708)	高い (7551)
B37	+	高い (10217)	高い (3231)
B40	-	高い (11615)	高い (10999)

20

## 【 0 1 9 4 】

(表3) 肺腫瘍におけるNOTCH2およびNOTCH3遺伝子発現レベル。NSCLC- 非小細胞肺癌 ; SCLC- 小細胞肺癌

	腫瘍	効果 (OMP-59R5 + タキソール)	N3 発現	N2 発現
NSCLC	Lu15	-	低い (440)	高い (1995)
NSCLC	Lu24	-	高い (5430)	高い (3105)
NSCLC	Lu25	-	高い (9768)	高い (3225)
NSCLC	Lu53	-	高い (12294)	高い (7828)
SCLC	Lu40	+	低い (423)	高い (1040)
SCLC	Lu61	+	高い (11732)	高い (1500)
SCLC	Lu65	+	低い (269)	高い (514)
SCLC	Lu66	+	低い (9)	低い (12)
SCLC	Lu67	-	高い (682)	高い (2214)
SCLC	Lu68	+	高い (838)	高い (3519)

30

## 【 0 1 9 5 】

腺臓腫瘍におけるNOTCH3遺伝子発現の高レベルとOMP-59R5/ゲムシタビン併用治療のインビオ効果の間の驚くべき相関関係をさらに分析した。NOTCH3遺伝子発現レベルを、標準的な多重転写産物シーケンシング(例えば、RNASeq)を用いて、PN11、PN13、PN23、PN04、PN08、PN16、PN17、PN21、およびPN25腺臓腫瘍細胞において決定した。RNASeqは、Illumina(登録商標)HiSeq(商標)2000シーケンシングシステムを用いてメーカーの使用説明書に従って実施した。図2Aは、増加したNOTCH3遺伝子発現が、ヒト腺臓異種移植モデルにおいてOMP-59R5/ゲムシタビン併用治療によるインビオ腫瘍抑制と有意に相関した( $0.823$ ;  $p < 0.021$ )ことを示している。図3はさらに、応答性腺臓腫瘍において検出されたNOTCH3遺伝子発現が非応答性腺臓腫瘍において検出された発現レベルよりも有意に高かったことを示す。

40

50

している。

#### 【0196】

図2Bは、ゲムシタビンと組み合わせたOMP-59R5抗NOTCH2/3抗体による治療に応答したヒト肺臓腫瘍(R=応答:ゲムシタビン治療単独と比較してp値(pval)<0.05)、およびゲムシタビンと組み合わせたOMP-59R5抗NOTCH2/3抗体による治療に非応答であることが判明した異種移植片(NR=非応答:ゲムシタビン治療単独と比較してp値>0.05)において検出されたNOTCH3遺伝子発現の分布を示す。非応答性肺臓腫瘍におけるNOTCH3遺伝子発現レベルの分布は、応答性肺臓腫瘍におけるNOTCH3遺伝子発現レベルの分布からの明確な分離を示した。

#### 【0197】

標準的な統計モデルであるロジスティック回帰を使用して、化学療法剤、例えばゲムシタビンと組み合わせたOMP-59R5による治療に対する特定の肺臓癌のインビオ応答性を、RNASeqによって肺臓癌において検出されたNOTCH3遺伝子発現レベルに基づいて予測した。Alan Agresti: An Introduction to Categorical Data Analysis, John Wiley and Sons, Inc. (1996)。この分析の結果は図4に示される。NOTCH3遺伝子発現データセットの陽性予測値(PPV)、陰性予測値(NPV)、感度(SENS)および特異度(SPEC)は、それぞれ83%、75%、83%、および75%であった。

#### 【0198】

ゲムシタビンと組み合わせたOMP-59R5を用いた治療に対する肺臓癌のインビオ応答性の予測の精度は、統計分析に肺臓癌からのMAML2遺伝子発現データを含めることによって、さらに改善された。NOTCH3およびMAML2遺伝子発現データセットにロジスティック回帰を適用することによって得られた結果は、図5に示される。NOTCH3およびMAML2遺伝子発現データセットの陽性予測値(PPV)、陰性予測値(NPV)、感度(SENS)および特異度(SPEC)は100%であった。この実験は、標準RNASeq法により得られた遺伝子発現データを用いて交差検証された。

#### 【0199】

##### 実施例3

###### 肺臓腫瘍サンプルにおけるNOTCH3タンパク質発現

ヒト肺臓腫瘍におけるNOTCH3タンパク質の発現を調べるためにNOTCH3ウェスタンプロット分析を実施した(図6A)。この分析で使用した抗NOTCH3抗体(Cell signaling社 #5276)は、完全長NOTCH3(FL:約250kDa)と、NOTCH3の膜貫通および細胞内領域(TM=約98kDa)との両方を検出した。

#### 【0200】

図6Bは、ゲムシタビンと組み合わせたOMP-59R5による治療に応答したヒト肺臓腫瘍(R=応答:ゲムシタビン治療単独と比較してp値<0.05)、および実施例1に記載の異種移植アッセイにおいてゲムシタビンと組み合わせたOMP-59R5による治療に非応答であることが判明した異種移植片(NR=非応答:ゲムシタビン治療単独と比較してp値>0.05)におけるNOTCH3タンパク質発現の分布を示す。応答腫瘍と非応答腫瘍の間のNOTCH3タンパク質発現の分布の分離は、NOTCH3遺伝子発現の分布の分離ほど顕著ではなかった。ロジスティック回帰を肺臓癌におけるNOTCH3タンパク質発現データに適用して、ゲムシタビンと組み合わせたOMP-59R5を用いた治療に対する特定の肺臓癌の感度を予測した。NOTCH3タンパク質発現データは、OMP-59R5とゲムシタビンの併用治療に対する応答を予測する上で、上述したNOTCH3遺伝子発現データの性能と同様の性能をもたらした。

#### 【0201】

##### 実施例4

###### qRT-PCRにより測定された転移性肺臓腫瘍サンプルにおけるNOTCH3遺伝子発現

NOTCH3遺伝子の発現は、転移性肺臓腫瘍サンプルにおいて標準的な定量qRT-PCRを用いて測定した。アッセイプローブは、NOTCH3 RefSeq mRNA配列NM\_000435.2を用いて設計した。NOTCH3\_A7は2つの潜在的な転写産物のいずれか1つを検出する一方で、NOTCH3\_A1はEnsemblデータベースにより予測された両方の転写産物を検出する。これらのプローブおよ

10

20

30

40

50

びqRT-PCRアッセイは、ヒト新鮮凍結(FF)およびホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)ヒト組織サンプルを用いて検証された。

#### 【0202】

(表3) NOTCH3 qRT-PCRアッセイで使用したプローブのスクレオチド配列

NOTCH3_A1	フォワード	AGGCAGAGTGGCGACCTC (SEQ ID NO:35)
	リバース	CGTCCACGTTCACTTCACAATT (SEQ ID NO:36)
	プローブ	AACCCAGGAAGACAGGCACAGTCGT (SEQ ID NO:37)
NOTCH3_A9	フォワード	CTGGGTTGAGGGTCAGAAT (SEQ ID NO:38)
	リバース	GGGCACTGGCAGTTATAGGT (SEQ ID NO:39)
	プローブ	TGACGCCATCCACGCATGTC (SEQ ID NO:40)
NOTCH3_A7	フォワード	TGCAGGATAGCAAGGAGGAGAC (SEQ ID NO:41)
	リバース	GCAGCTTGGCAGCCTCATAG (SEQ ID NO:42)
	プローブ	CTCGCGGGCGGCCAGGAATAGGG (SEQ ID NO:43)

#### 【0203】

一次(first-line)膵臓癌患者由来の約100のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)転移性腫瘍組織の供給を受けて、このコホートにおけるNOTCH3発現のレベルおよび分布を調べた(図7)。NOTCH3遺伝子の発現は、標準的な定量RT-PCRプロトコルを用いてNOTCH3\_A7プライマー/プローブセットにより測定した。ANOVA統計分析を行って、NOTCH3のレベルがサンプルの経年、性別、患者の年齢などの要因と関連するかどうかを調べた。NOTCH3レベルは、有意性およびより広いNOTCH3遺伝子発現分布を示した肝臓への転移部位を別にすれば、これらの要因のいずれとも関連しないことが分かった。図7は、試験した全ての転移性腫瘍サンプルにわたるNOTCH3遺伝子発現についての10、25、50、75、および90パーセンタイル値を表示している。

#### 【0204】

供給されたヒト肝臓およびリンパ節転移性膵臓癌組織および異種移植アッセイで使用された原発性ヒト膵臓腫瘍からのNOTCH3遺伝子発現レベルは、データを比較するために正規化された。データの平均値を減算し、各データセットの標準偏差で割った。灰色(明るい)ドットは、実施例1に記載の異種移植アッセイにおいてゲムシタビンと組み合わせたOMP-59R5による治療に対して非応答性であったヒト膵臓腫瘍を表し、黒色(暗い)ドットは、異種移植アッセイにおいて応答性であったヒト膵臓腫瘍を表す(図8)。応答性の腫瘍は、非応答性のものよりも高いNOTCH3遺伝子発現レベルを示し、このことは、NOTCH3遺伝子発現を用いて、例えば化学療法剤と組み合わせたOMP-59R5による、治療に対する膵臓腫瘍のインビオ応答性を予測することができるることを示している。図8はまた、試験したヒト肝臓およびリンパ節転移性膵臓癌組織におけるNOTCH3遺伝子発現についての10、25、50、75、および90パーセンタイル値を表示している。

#### 【0205】

##### 実施例6

ゲムシタビンおよびアブラキサン(商標)と組み合わせたOMP-59R5抗NOTCH2/3抗体は膵臓腫瘍のインビオ増殖を抑制する

20,000個のOMP-PN8(NOTCH3高発現性)腫瘍細胞をNOD-SCIDマウスに注入した。腫瘍が110mm<sup>3</sup>の平均体積に達するまで、腫瘍を26日間増殖させた。腫瘍を持つマウスを無作為に3つのグループ(グループあたりのマウスn=9)に分けて、対照抗体、ゲムシタビンとアブラキサン(商標)(アルブミン結合パクリタキセル)の組み合わせ、またはOMP-59R5抗NOTCH2/3抗体とゲムシタビンとアブラキサン(商標)の組み合わせにより治療した。OMP-59R5は40mg/kgで1週間おきに投与した。ゲムシタビンは10mg/kgで週1回投与し、アブラキサン(商標)は30mg/kgで週1回投与した。腫瘍体積を治療後の指定された日に測定した。OMP-59R5はゲムシタビンおよびアブラキサン(商標)と組み合わせたときOMP-PN8腫瘍の増殖を強く抑制し、ゲムシタビンとアブラキサン(商標)のみの組み合わせよりも活性があった(図9)。上と下のグラフは、異なるスケールでの同じ実験から得られたデータを示している。下のグラフは、積極的治療グループから得られたデータのみを示しており、対照治療動物から得ら

10

20

30

40

50

れたデータは示していない。これらの結果は、NOTCH3発現レベルを使用して、各種の化学療法剤と組み合わせたOMP-59R5抗体による治療に対する膵臓腫瘍のインビボ応答性を予測することができることを示している。

## 【0206】

本明細書に引用された全ての刊行物、特許、特許出願、インターネットサイト、およびアクセッション番号/データベース配列(ポリヌクレオチド配列とポリペプチド配列の両方を含む)は、個々の刊行物、特許、特許出願、インターネットサイト、またはアクセッション番号/データベース配列が参照により本明細書に組み込まれることが具体的かつ個々に示されているのと同程度に、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

10

## 【0207】

配列

SEQ ID NO:1

HKGAL

SEQ ID NO:1

HEDA I

SEQ ID NO:3: 59R1重鎖CDR1

SSSGMS

20

SEQ ID NO:4: 59R1重鎖CDR2

VIASSGSNTYYADSVKG

SEQ ID NO:5: 59R1重鎖CDR3

GIFFAI

SEQ ID NO:6: 59R1軽鎖CDR1

RASQSVRSNYLA

30

SEQ ID NO:7: 59R1軽鎖CDR2

GASSRAT

SEQ ID NO:8: 59R1軽鎖CDR3

QQYSNFP I

SEQ ID NO:9: 59R5重鎖CDR3

SIFYTT

SEQ ID NO:10 (重鎖CDR3コンセンサス配列):

(G/S) (I/S) F(F/Y) (A/P) (I/T/S/N)

40

SEQ ID NO:11 (代替重鎖CDR3)

SIFYPT

SEQ ID NO:12 (代替重鎖CDR3)

SSFFAS

SEQ ID NO:13 (代替重鎖CDR3)

SSFYAS

50

SEQ ID NO:14 (代替重鎖CDR3)

SSFFAT

SEQ ID NO:15 (代替重鎖CDR3)

SIFYPS

SEQ ID NO:16 (代替重鎖CDR3)

SSFFAN

10

SEQ ID NO:17: 59R5重鎖可変領域

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWWSVIASSGSNTYY  
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGTIVTVSSA

SEQ ID NO:18: 59R1 IgG抗体の59R1重鎖VH

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWWSVIASSGSNTYYADSVKGRF  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTIVTVSSA

SEQ ID NO:19: 59R1重鎖VH + 哺乳動物シグナル配列(下線)

MKHLWFFLLVAAPRWVLSQVQIVESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAP  
GKGLEWWSVIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIF  
FAIWGQGTIVTVSSA

20

SEQ ID NO:20: 変異型59R1重鎖可変領域

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWWSVIASSGSNTYYADSVKGRF  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYPTWGQGTIVTVSSA

SEQ ID NO:21: 変異型59R1重鎖可変領域

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWWSVIASSGSNTYYADSVKGRF  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFASWGQGTIVTVSSA

30

SEQ ID NO:22: 変異型59R1重鎖可変領域

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWWSVIASSGSNTYYADSVKGRF  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFYASWGQGTIVTVSSA

SEQ ID NO:23: 変異型59R1重鎖可変領域

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWWSVIASSGSNTYYADSVKGRF  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFATWGQGTIVTVSSA

40

SEQ ID NO:24: 変異型59R1重鎖可変領域

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWWSVIASSGSNTYYADSVKGRF  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYPSWGQGTIVTVSSA

SEQ ID NO:25: 変異型59R1重鎖可変領域

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWWSVIASSGSNTYYADSVKGRF  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFANWGQGTIVTVSSA

SEQ ID NO:26: 59RGV抗体の59R1重鎖VH (59R1の生殖細胞系列変異体)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWWSVIASSGSNTYYADSVKGRF  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTIVTVSSA

50

SEQ ID NO:27: 59RGV抗体の59R1軽鎖VL (59R1の生殖細胞系列変異体)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPARFSGSG  
SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO:28: 59R1軽鎖VL + 哺乳動物シグナル配列(下線)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQK  
PGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFLTISSEPEDFAVYYCQQYSNFPITFG  
QGTKVEIKR

10

SEQ ID NO:29: 59R1 IgG抗体の59R1軽鎖VL

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGS  
GTDFTLTISSEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO:30: 59R5重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWWSVIASSGSNTYY  
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGTLVTVSSASTKG  
PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNGALTSGVHTFPAAVLQSSGLYSL  
SSVTVVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK  
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTFRVVSVL  
TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT  
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS  
VMHEALHNHYTQKSLSLSPKG

20

SEQ ID NO:31: 抗NOTCH2/3 59R1 IgG2重鎖の予測されたタンパク質配列、+ シグナル配列。  
シグナル配列には下線が引かれている。

MKHLWFFLLVAAPRWVLSQLVQQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWWS  
VIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTLVTVSSAS  
TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNGALTSGVHTFPAAVLQSSGLYSLSSVVT  
VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
TCVVVDVSCHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG  
LPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP  
PMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPKG

30

SEQ ID NO:32: 抗NOTCH2/3 59RGVの重鎖(59R1の生殖細胞系列変異体)の予測されたタンパク質配列、+ シグナル配列。シグナル配列には下線が引かれている。

MKHLWFFLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWWS  
VIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTLVTVSSAS  
TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNGALTSGVHTFPAAVLQSSGLYSLSSVVT  
VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
TCVVVDVSCHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG  
LPAPIEKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP  
PMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPKG

40

SEQ ID NO:33: 抗NOTCH2/3 59R1軽鎖の予測されたタンパク質配列、+ シグナル配列。シグナル配列には下線が引かれている。

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLL  
IYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFLTISSEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLTLSK  
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

50

SEQ ID NO:34: 抗NOTCH2/3 59RGV抗体の軽鎖(59R1の生殖細胞系列変異体)の予測されたタンパク質配列、+ シグナル配列。シグナル配列には下線が引かれている。

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRL  
LIYGASSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGTKVEIKRTVAAPS  
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS  
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:35

AGGCAGAGTGGCGACCTC

10

SEQ ID NO:36

CGTCCACGTTCACTTCACAATT

SEQ ID NO:37

AACCCAGGAAGACAGGCACAGTCGT

SEQ ID NO:38

CTGGGTTTGAGGGTCAGAAT

20

SEQ ID NO:39

GGGCACTGGCAGTTATAGGT

SEQ ID NO:40

TGACGCCATCCACGCATGTC

SEQ ID NO:41

TGCAGGATAGCAAGGAGGAGAC

SEQ ID NO:42

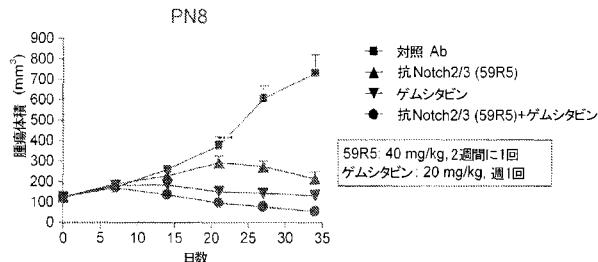
GCAGCTTGGCAGCCTCATAG

30

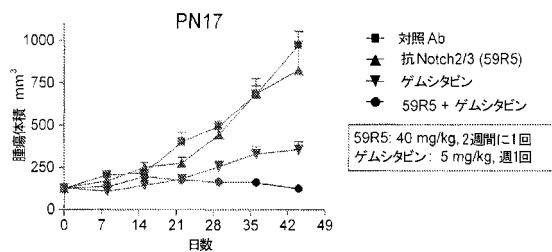
SEQ ID NO:43

CTCGCGGGCGGCCAGGAATAGGG

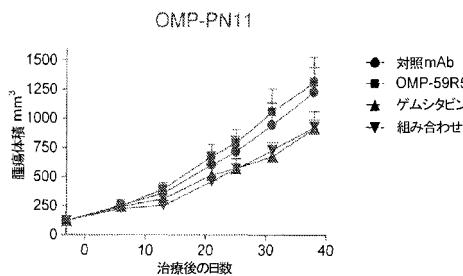
【図1A】



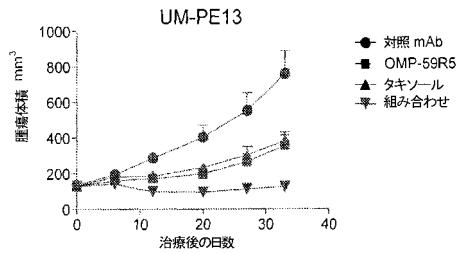
【図1B】



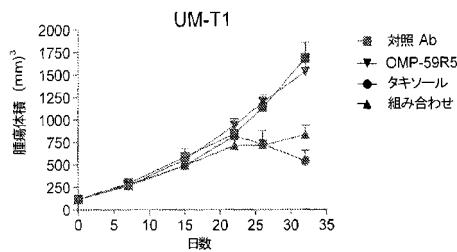
【図1C】



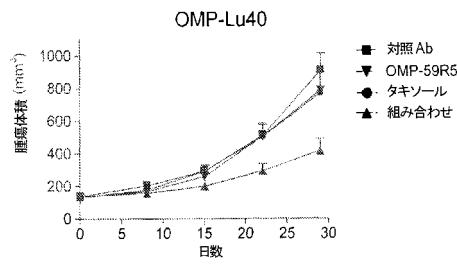
【図1D】



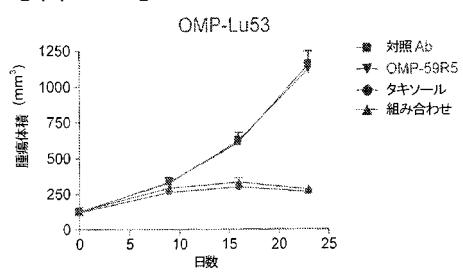
【図1E】



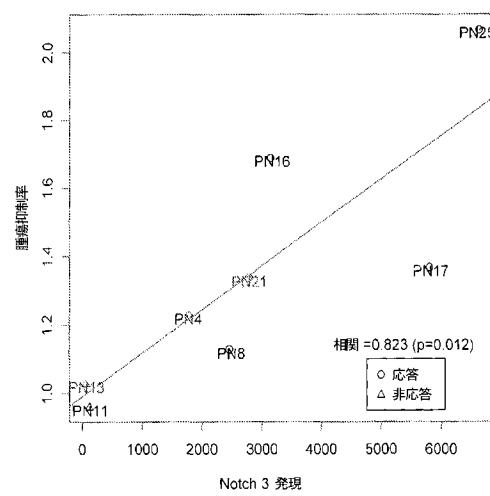
【図1F】



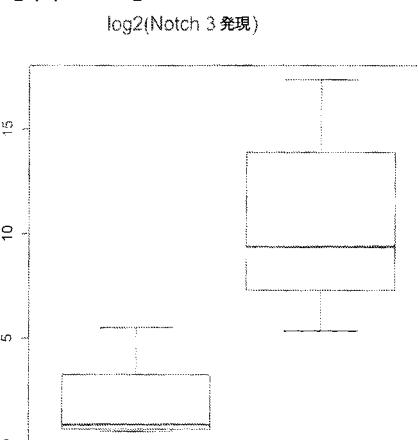
【図1G】



【図2A】

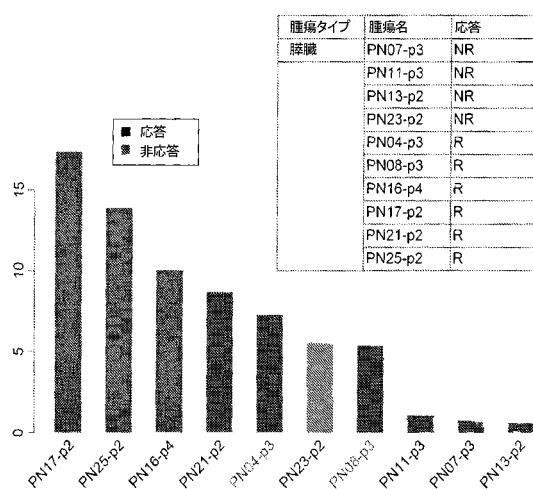


【図2B】



【図3】

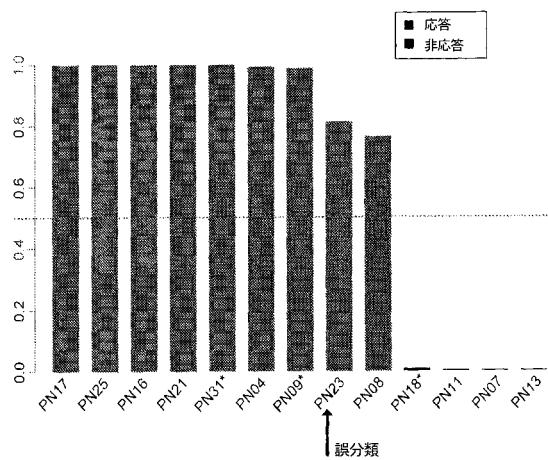
NOTCH3 RPKM カウント数



Notch3はRとNR間で異なって発現される:p値=0.0006

【図4】

分類確率



## 分類器:ロジスティック回帰

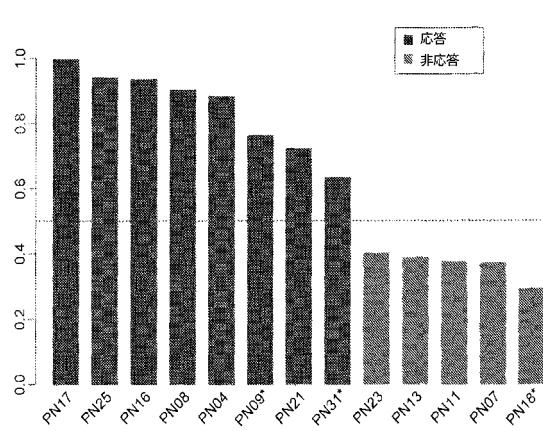
交差検証されたPPV=83%, NPV=75%, SENS=83%, SPEC=75%

予測された応答腫瘍: PN31, PN09

予測された非応答腫瘍: PN18

【図5】

分類確率



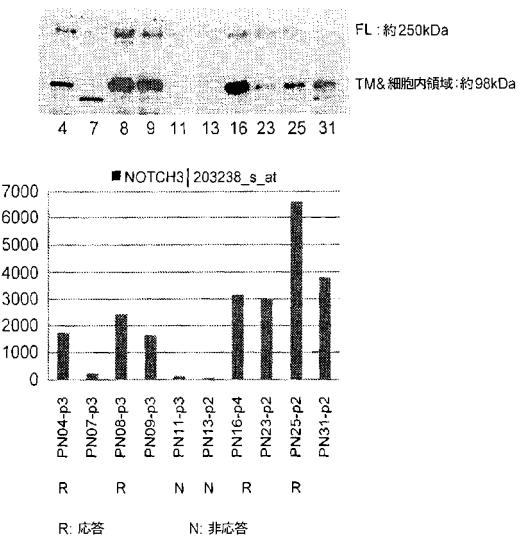
予測された応答腫瘍: PN09, PN31

予測された非応答腫瘍: PN18

PPV=NPV=SENS=SPEC=100%はRNA-seq法で交差検証された

【図6 A】

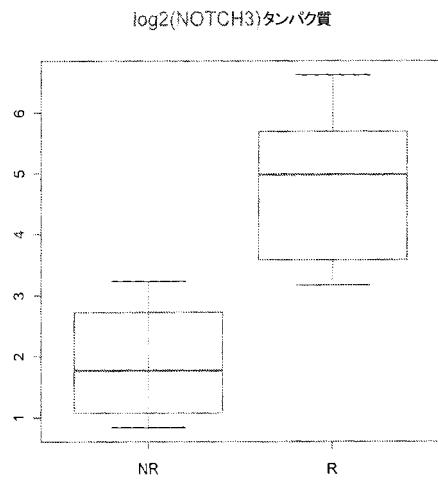
膵臓腫瘍



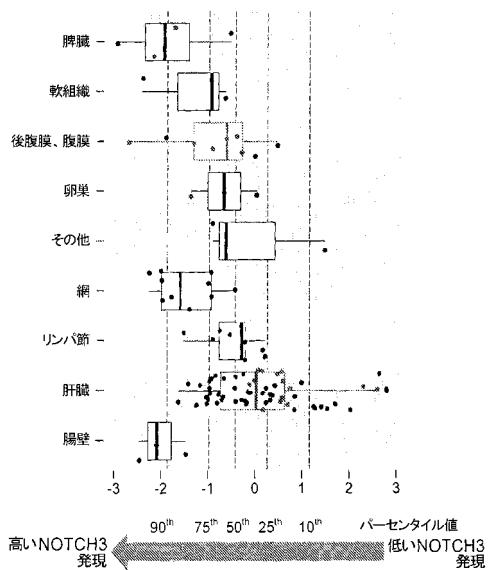
R: 応答

N: 非応答

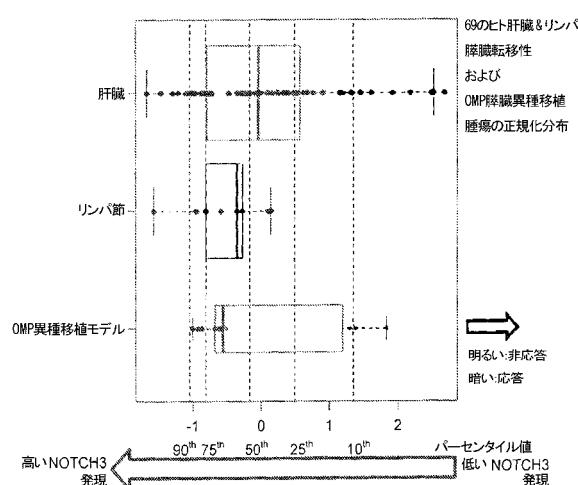
【図 6 B】



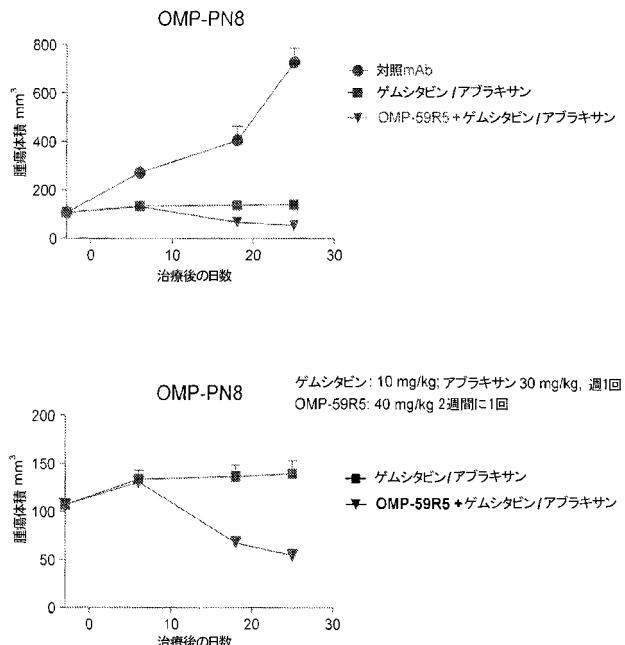
【図 7】



【図 8】



【図 9】



**【手続補正書】**

【提出日】平成27年12月21日(2015.12.21)

**【手続補正1】**

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

**【補正の内容】****【0038】**

別の局面において、本発明は、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、およびSEQ ID NO:43からなる群より選択される配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブを提供する。

**[本発明1001]**

NOTCH阻害剤による治療のための膵臓癌患者を選択するための方法であって、

(a)該患者由来の腫瘍細胞における1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルを決定する段階であって、該1つまたは複数のバイオマーカーがNOTCH3を含む、段階、および

(b)該1つまたは複数のバイオマーカーの発現レベルに基づいて該患者を選択する段階を含む、方法。

**[本発明1002]**

膵臓癌と診断された患者がNOTCH阻害剤ベースの療法に応答する可能性があるかどうか、またはNOTCH阻害剤による治療を継続すべきかどうかを判定するための方法であって、該方法が該患者由来の腫瘍細胞における1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルを決定する段階を含み、該1つまたは複数のバイオマーカーがNOTCH3を含み、該1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルが、該患者が療法に応答する可能性があることを示す、方法。

**[本発明1003]**

患者における膵臓癌を治療する方法であって、

(a)該患者由来の腫瘍細胞における1つまたは複数のバイオマーカーの発現のレベルを決定する段階であって、該1つまたは複数のバイオマーカーがNOTCH3を含む、段階；および

(b)該患者に、治療上有効量のNOTCH阻害剤を投与する段階を含む、方法。

**[本発明1004]**

バイオマーカーの各々が、該バイオマーカーについての参照レベルを上回るレベルで発現されると決定される、本発明1001～1003のいずれかの方法。

**[本発明1005]**

1つまたは複数のバイオマーカーの発現レベルが、該バイオマーカーのmRNAのレベルまたは該バイオマーカーのタンパク質のレベルを測定することによって決定される、本発明1001～1004のいずれかの方法。

**[本発明1006]**

バイオマーカーのmRNAのレベルが、定量的ポリメラーゼ連鎖反応によってまたはアレイハイブリダイゼーションによって測定される、本発明1005の方法。

**[本発明1007]**

バイオマーカーがNOTCH3であり、そのmRNAレベルが

(a)SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:38、およびSEQ ID NO:41からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するフォワードプライマー；

(b)SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、およびSEQ ID NO:42からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するリバースプライマー；ならびに/または

(c)SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、およびSEQ ID NO:43からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブを用いて測定される、本発明1006の方法。

**[本発明1008]**

NOTCH3のmRNAレベルが

(a) SEQ ID NO:35の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:36の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:37の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ；

(b) SEQ ID NO:38の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:39の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:40の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ；または

(c) SEQ ID NO:41の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:42の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:43の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ

を用いて測定される、本発明1007の方法。

[本発明1009]

1つまたは複数のバイオマーカーがMAML2をさらに含み、MAML2発現のレベルがMAML2発現についての参照レベルを上回っていると決定される、本発明1001～1008のいずれかの方法。

[本発明1010]

バイオマーカーの参照レベルが所定の値であるか、または対照サンプル中の該バイオマーカーの発現のレベルである、本発明1001～1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

NOTCH3発現についての参照レベルが、膵臓癌または膵臓癌のサブセットにおけるNOTCH3発現についての25パーセンタイル値、30パーセンタイル値、40パーセンタイル値、50パーセンタイル値、60パーセンタイル値、70パーセンタイル値、75パーセンタイル値、または80パーセンタイル値である、本発明1001～1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

前記患者からサンプルを取得する段階を含む、本発明1001～1011のいずれかの方法。

[本発明1013]

前記サンプルが全血、血漿、血清、または組織である、本発明1012の方法。

[本発明1014]

前記サンプルが膵臓腫瘍サンプルである、本発明1012または1013の方法。

[本発明1015]

前記サンプルがホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織である、本発明1012～1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

NOTCH阻害剤を前記患者に投与する段階をさらに含む、本発明1001、1002、または1004～1015のいずれかの方法。

[本発明1017]

NOTCH阻害剤がセクレターゼ阻害剤または抗NOTCH抗体である、本発明1001～1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

抗NOTCH抗体がヒトNOTCH2および/またはヒトNOTCH3に特異的に結合する、本発明1017の方法。

[本発明1019]

抗NOTCH抗体が、ATCCにPTA-9547として寄託されたポリヌクレオチドによりコードされる、本発明1018の方法。

[本発明1020]

抗NOTCH抗体がヒトNOTCH2および/またはヒトNOTCH3に特異的に結合し、該抗体が、

(a) SSSGMS (SEQ ID NO:3) を含む重鎖CDR1、

VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:4)

を含む重鎖CDR2、およびSIFYTT (SEQ ID NO:9) もしくはGIFFAI (SEQ ID NO:5) を含む重鎖CDR3；ならびに

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:7)を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFPI(SEQ ID NO:8)を含む軽鎖CDR3

を含むか；または

(b)SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、もしくはSEQ ID NO:26に対して少なくとも約90%の配列同一性を有する重鎖可変領域；およびSEQ ID NO:29もしくはSEQ ID NO:27に対して少なくとも約90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域  
を含む、本発明1017の方法。

[本発明1021]

抗NOTCH抗体が、ヒトNOTCH2および/またはNOTCH3への特異的結合について、

(a)SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:18を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:29を含む軽鎖可変領域を含む、抗体と；

(b)SSSGMS(SEQ ID NO:3)を含む重鎖CDR1、VIASSGSNTYYADSVKG(SEQ ID NO:4)  
を含む重鎖CDR2、およびSIFYTT(SEQ ID NO:9)を含む重鎖CDR3、ならびに  
RASQSVRSNYLA(SEQ ID NO:6)  
を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:7)を含む軽鎖CDR2、およびQQYSNFPI(SEQ ID NO:8)  
を含む軽鎖CDR3を含む、抗体と；

(c)ATCCにPTA-9547として寄託されたポリヌクレオチドによりコードされる抗体と  
からなる群より選択される抗体と競合する、本発明1017の方法。

[本発明1022]

抗NOTCH抗体がモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、または抗体断片である、本発明1017～1021のいずれかの方法。

[本発明1023]

第2の治療剤を投与する段階をさらに含み、任意で、第2の治療剤が化学療法剤、ヌクレオシド類似体、または有糸分裂阻害剤である、本発明1003または1016～1022のいずれかの方法。

[本発明1024]

SEQ ID NO:35～43からなる群より選択される配列を含む単離されたポリヌクレオチドを含む、診断用組成物。

[本発明1025]

(a)SEQ ID NO:35の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:36の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:37の配列を有するポリヌクレオチド；

(b)SEQ ID NO:38の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:39の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:40の配列を有するポリヌクレオチド；または

(c)SEQ ID NO:41の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:42の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:43の配列を有するポリヌクレオチド  
を含む、本発明1024の診断用組成物。

[本発明1026]

サンプル中のNOTCH3 mRNAを検出する方法であって、該サンプルを、SEQ ID NO:35～43からなる群より選択される配列を含むポリヌクレオチドと接触させる段階を含む、方法。

[本発明1027]

前記サンプルを、

(a)SEQ ID NO:35の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:36の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:37の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ；

(b)SEQ ID NO:38の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:39の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:40の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ；または

(c)SEQ ID NO:41の配列を有するフォワードプライマー、SEQ ID NO:42の配列を有するリバースプライマー、およびSEQ ID NO:43の配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ；

ープ

と接触させる段階を含む、本発明1026の方法。

[本発明1028]

サンプル中のNOTCH3 mRNAを検出するためのキットであって、SEQ ID NO:35～43からなる群より選択される配列を含むポリヌクレオチドを含む、キット。

[本発明1029]

(a)SEQ ID NO:35の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:36の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:37の配列を有するポリヌクレオチド；

(b)SEQ ID NO:38の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:39の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:40の配列を有するポリヌクレオチド；または

(c)SEQ ID NO:41の配列を有するポリヌクレオチド、SEQ ID NO:42の配列を有するポリヌクレオチド、およびSEQ ID NO:43の配列を有するポリヌクレオチドを含む、本発明1028のキット。

[本発明1030]

SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、およびSEQ ID NO:42からなる群より選択される配列を有するプライマー。

[本発明1031]

SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、およびSEQ ID NO:43からなる群より選択される配列を有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0099

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0099】

特定の態様では、本発明の方法において有用である抗NOTCH抗体は、ヒトNOTCH2および/またはNOTCH3に特異的に結合し、(a)SSSGMS(SEQ ID NO:3)を含む重鎖CDR1、VIASSGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO:4)

を含む重鎖CDR2、および/もしくは

(G/S)(I/S)F(F/Y)(A/P)(I/T/S/N) (SEQ ID NO:10)

を含む重鎖CDR3；ならびに/または(b)

RASQSVRSNYLA (SEQ ID NO:6)

を含む軽鎖CDR1、GASSRAT(SEQ ID NO:7)を含む軽鎖CDR2、および/もしくはQQYSNFP(I(SEQ ID NO:8)を含む軽鎖CDR3を含む。ある態様では、抗体は、SIFYPT(SEQ ID NO:11)を含む重鎖CDR3を含む。ある態様では、抗体は、SSFFAS(SEQ ID NO:12)を含む重鎖CDR3を含む。他の態様では、抗体は、SSFYAS(SEQ ID NO:13)を含む重鎖CDR3を含む。特定の態様では、抗体は、SSFFAT(SEQ ID NO:14)を含む重鎖CDR3を含む。ある態様では、抗体は、SIFYPS(SEQ ID NO:15)を含む重鎖CDR3を含む。さらに他の態様では、抗体は、SSFFAN(SEQ ID NO:16)を含む重鎖CDR3を含む。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0207

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0207】

配列

SEQ ID NO:1

HKGAL

SEQ ID NO:2

HEDA I

SEQ ID NO:3: 59R1重鎖CDR1  
SSSGMS

SEQ ID NO:4: 59R1重鎖CDR2  
VIASSGSNTYYADSVKG

SEQ ID NO:5: 59R1重鎖CDR3  
GIFFAI

SEQ ID NO:6: 59R1軽鎖CDR1  
RASQSVRSNYLA

SEQ ID NO:7: 59R1軽鎖CDR2  
GASSRAT

SEQ ID NO:8: 59R1軽鎖CDR3  
QQYSNFP I

SEQ ID NO:9: 59R5重鎖CDR3  
SIFYTT

SEQ ID NO:10 (重鎖CDR3コンセンサス配列):  
(G/S) (I/S) F(F/Y) (A/P) (I/T/S/N)

SEQ ID NO:11 (代替重鎖CDR3)  
SIFYPT

SEQ ID NO:12 (代替重鎖CDR3)  
SSFFAS

SEQ ID NO:13 (代替重鎖CDR3)  
SSFYAS

SEQ ID NO:14 (代替重鎖CDR3)  
SSFFAT

SEQ ID NO:15 (代替重鎖CDR3)  
SIFYPS

SEQ ID NO:16 (代替重鎖CDR3)  
SSFFAN

SEQ ID NO:17: 59R5重鎖可変領域  
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYY  
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGTLVTVSSAST

SEQ ID NO:18: 59R1 IgG抗体の59R1重鎖VH

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKG  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWQGTLTVSSA

SEQ ID NO:19: 59R1重鎖VH + 哺乳動物シグナル配列(下線)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAP  
GKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKGRTIISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIF  
FAIWQGTLTVSSA

SEQ ID NO:20: 変異型59R1重鎖可変領域

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKG  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYPTWGQGTLTVSSA

SEQ ID NO:21: 変異型59R1重鎖可変領域

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKG  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFASWGQGTLTVSSA

SEQ ID NO:22: 変異型59R1重鎖可変領域

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKG  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFYASWGQGTLTVSSA

SEQ ID NO:23: 変異型59R1重鎖可変領域

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKG  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFATWGQGTLTVSSA

SEQ ID NO:24: 変異型59R1重鎖可変領域

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKG  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYPSWGQGTLTVSSA

SEQ ID NO:25: 変異型59R1重鎖可変領域

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKG  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSFFANWGQGTLTVSSA

SEQ ID NO:26: 59RGV抗体の59R1重鎖VH (59R1の生殖細胞系列変異体)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWVSVIASSGSNTYYADSVKG  
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWQGTLTVSSA

SEQ ID NO:27: 59RGV抗体の59R1軽鎖VL (59R1の生殖細胞系列変異体)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPARFSGSG  
SGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGKVEIKR

SEQ ID NO:28: 59R1軽鎖VL + 哺乳動物シグナル配列(下線)

MVLQTQVFISLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQK  
PGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFG  
QGKVEIKR

SEQ ID NO:29: 59R1 IgG抗体の59R1軽鎖VL

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSGSGS  
GTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQYSNFPITFGQGKVEIKR

SEQ ID NO:30: 59R5重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWWSVIASSGSNTYY  
 ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSIFYTTWGQGTLVTVSASTKG  
 PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP~~A~~VLQSSGLYSL  
 SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK  
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL  
 TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI~~S~~TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT  
 CLVKGFYPSDI~~A~~VEWESNGQPENNYKTPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS  
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:31: 抗NOTCH2/3 59R1 IgG2重鎖の予測されたタンパク質配列、+ シグナル配列。  
 シグナル配列には下線が引かれている。

MKHLWFFILLVAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWWS  
 VIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTLVTVSAS  
 TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP~~A~~VLQSSGLYSLSSVVT  
 VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPPKD~~T~~LMISRTPEV  
 TCVVVVDVSCHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG  
 LPAPIEKTI~~S~~TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI~~A~~VEWESNGQPENNYKTP  
 PMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:32: 抗NOTCH2/3 59RGVの重鎖(59R1の生殖細胞系列変異体)の予測されたタンパク質配列、+ シグナル配列。シグナル配列には下線が引かれている。

MKHLWFFILLVAAPRWVLSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSGMSWVRQAPGKGLEWWS  
 VIASSGSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIFFAIWGQGTLVTVSAS  
 TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP~~A~~VLQSSGLYSLSSVVT  
 VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPPKD~~T~~LMISRTPEV  
 TCVVVVDVSCHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG  
 LPAPIEKTI~~S~~TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI~~A~~VEWESNGQPENNYKTP  
 PMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:33: 抗NOTCH2/3 59R1軽鎖の予測されたタンパク質配列、+ シグナル配列。シグナル配列には下線が引かれている。

MVLQTQVFISLLWISGAYGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRLL  
 IYGASSRATGVPARFSGSGSGTDF~~T~~LT~~I~~SSLEPEDFAVYYCQQYSNF~~P~~ITFGQG~~T~~KVEIKRTVAAPS  
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN~~N~~FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD~~T~~YSTS~~L~~STLTLS  
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT~~K~~FSNR~~G~~C

SEQ ID NO:34: 抗NOTCH2/3 59RGV抗体の軽鎖(59R1の生殖細胞系列変異体)の予測されたタンパク質配列、+ シグナル配列。シグナル配列には下線が引かれている。

MVLQTQVFISLLWISGAYGEVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLAWYQQKPGQAPRL  
 LIYGASSRATGI~~P~~ARFSGSGSGTDF~~T~~LT~~I~~SSLEPEDFAVYYCQQYSNF~~P~~ITFGQG~~T~~KVEIKRTVAAPS  
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN~~N~~FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD~~T~~YSTS~~L~~STLTLS  
 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT~~K~~FSNR~~G~~C

SEQ ID NO:35

AGGCAGAGTGGCGACCTC

SEQ ID NO:36

CGTCCACGTTCACTTCACAATT~~C~~

SEQ ID NO:37

AACCCAGGAAGACAGGCACAGTCGT

SEQ ID NO:38  
CTGGGTTTGAGGGTCAGAAT

SEQ ID NO:39  
GGGCAC TGGCAGTTATAGGT

SEQ ID NO:40  
TGACGCCATCCACGCATGTC

SEQ ID NO:41  
TGCAGGATAGCAAGGAGGAGAC

SEQ ID NO:42  
GCAGCTTGGCAGCCTCATAG

SEQ ID NO:43  
CTCGCGGGCGGCCAGGAATAGGG

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2016520289000001.app

## 【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT** **PCT/US2014/026094 03.10.2014**  
 International application No.  
**PCT/US 14/26094**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12Q 1/68; G01N 33/53, 33/574; A61K 35/00 (2014.01) CPC - C12Q 1/6886; A61K 38/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) CPC: C12Q 1/6886; A61K 38/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC: C12Q 1/6886; A61K 38/00 (text search) USPC: 435/6.14, 7.1, 7.23; 514/19.3; 530/350 (text search)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Scholar, Google Patents, GenCore sequence search (NT) Search terms: NOTCH3, pancreatic cancer, monoclonal antibody, decoy, gamma secretase inhibitor (GSI)(e.g. MRK-003), antagonist, diagnosis, treatment, transcriptional target (HES1, HEY1); Mastermind-like protein 2 (MAML2)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	COOK et al. Gamma secretase inhibition promotes hypoxic necrosis in mouse pancreatic ductal adenocarcinoma. J Exp Med 12 March 2012 Vol 209 No 3 Pages 437-444. Especially pg 437 col 2 para 1, pg 438 col 1 para 1, pg 438 fig 1A,1D.	1-9, 23-26
Y	US 2009/0092615 A1 (DANG et al.) 9 April 2009 (09.04.2009). Especially para [0042].	27, 28
A	US 2012/0328608 A1 (Siebel) 27 December 2012 (27.12.2012). Especially claims 17 and 21.	1-9, 23-26
X,P	TAKEBE et al. Targeting notch signaling pathway in cancer: clinical development advances and challenges. ePub 27 September 2013 Vol 141 No 2 Pages 140-149. Especially pg 142 col 1 para 3, pg 144 table 1.	1-9, 23-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search  9 July 2014 (09.07.2014)	Date of mailing of the international search report  03 OCT 2014	
Name and mailing address of the ISA/US  Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT****014/026094-03-10-2014**

International application No.

PCT/US 14/26094

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

## a. (means)

- on paper  
 in electronic form

## b. (time)

- in the international application as filed  
 together with the international application in electronic form  
 subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

## 3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 35-37

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT****014/026094 03.10.2014**

International application No.

PCT/US 14/26094

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
3.  Claims Nos.: 10-22, 29-72 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
—go to Extra Sheet for continuation—

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Claims 1-9, 23-28

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

014/026094 03.10.2014

International application No.

PCT/US 14/26094

## Continuation of Box III (Lack of Unity of Invention)

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

**Group I:** Claims 1-9, 23-28 drawn to a method for determining whether a patient diagnosed with pancreatic cancer is likely to respond to a NOTCH inhibitor-based therapy and a method of treating pancreatic cancer in a patient, comprising determining the expression level of NOTCH3.

**Group II:** Claims 73-80, drawn to a method of detecting NOTCH3 mRNA and a composition or a kit comprising a forward primer, a reverse primer and a probe. Group II+ will be searched upon payment of additional fee(s). An exemplary election would be: the first named forward primer, reverse primer and probe comprising SEQ ID NOs: 35, 36 and 37. It is believed that claims 73-80 read on this named invention. Applicants must indicate, if applicable, which claims read on this named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the '+' group(s) will result in only the first named invention to be searched/examined.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

## Special Technical Features:

Group I has the special technical feature of a method for determining whether a patient diagnosed with pancreatic cancer is likely to respond to a NOTCH inhibitor-based therapy, not required by Group II.

Group II has the special technical feature of detecting NOTCH3 mRNA comprising a forward primer, a reverse primer and a probe having specific nucleotide sequences, not required of Groups I.

## Common Technical Features:

Groups I and II share the common technical feature of measuring the expression level of NOTCH3.

However, the common technical feature of Groups I and II do not represent a contribution over the prior art, and is obvious over the publication titled "Gamma secretase inhibition promotes hypoxic necrosis in mouse pancreatic ductal adenocarcinoma" by COOK et al. (hereinafter "Cook") [J Exp Med 12 March 2012 Vol 209 No 3 Pages 437-444].

Cook discloses measuring the expression level of NOTCH3 using either polynucleotides (pg 443 col 1 para 7; Quantitative PCR) or antibodies (pg 443 col 1 para 5) in pancreatic cancer samples (pg 438 fig 1A; "Expression of Notch ligands (DLL4 and Jagged1) and receptor (Notch 3) in mouse (left) and human (right) pancreatic cancer specimens"; pg 438 fig 1D- " Quantitative real-time PCR showing relative mRNA expression of Notch pathway components [including Notch3] in PDA [pancreatic ductal adenocarcinoma] tissue from mice treated with vehicle (n = 5) or MRK003 (n = 6) for 10 d").

Further, WO/2009/025867 A2 to KITAJEWSKI et al. (hereinafter "Kitajewski") teach a polynucleotide sequence (SEQ ID NO: 13; 3,974 nt) comprising instant application SEQ ID NO: 35 (SEQ ID NO: 13; nt 637-654 100% sequence identity), SEQ ID NO: 36 (SEQ ID NO: 13; nt 693-715 100% sequence identity) and SEQ ID NO: 37 (SEQ ID NO: 13; nt 659-683 100% sequence identity) such that an artisan of ordinary skill in the art would have known how to design primers and probes using the sequence disclosed by Kitajewski.

As the common technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a common special technical feature that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I and II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## Note concerning Item 4:

Claims 10-22 and 29-72 are multiple dependent claims and are not drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

## フロントページの続き

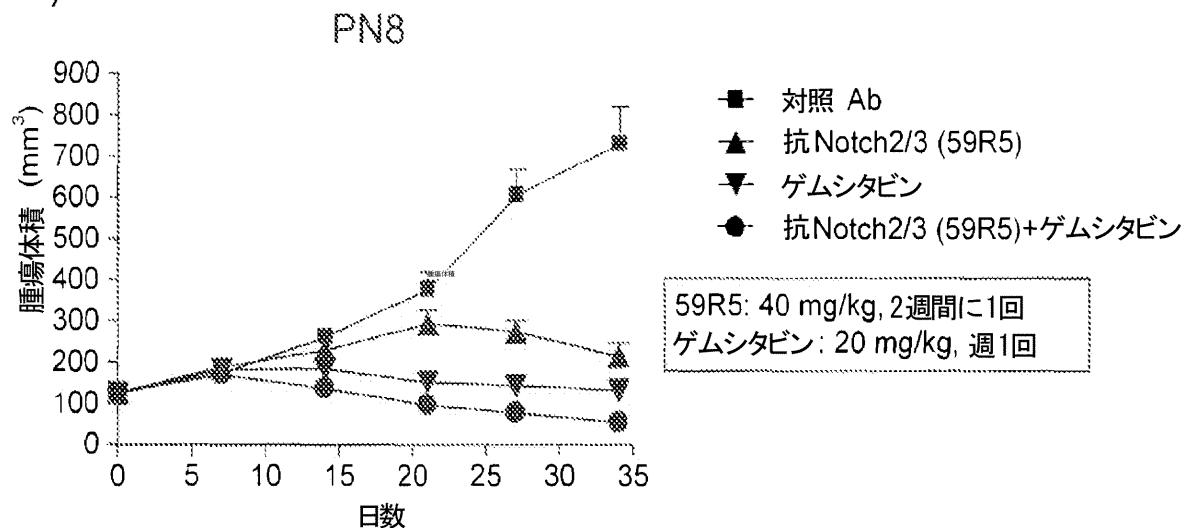
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
	C 0 7 K 16/28	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,H,R,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100142929 弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699 弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048 弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506 弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100114340 弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889 弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072 弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ホーイ ティモシー チャールズ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ヒルズバラ ダレル ロード 200
(72)発明者 チャン チュン アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロ アルト アシュトン アベニュー 570
(72)発明者 カボウン アン エム. アメリカ合衆国 カリフォルニア州 マウンテン ビュー アーホーン アベニュー 686
F ターム(参考) 2G045 AA26 CA25 CA26 CB02 DA14 DA36 FB02 FB03 4B024 AA01 AA12 CA09 CA12 CA20 HA12 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ08 QQ53 QR55 QR62 QS25 QS34 4C084 AA17 AA20 MA02 NA05 ZA661 ZA662 ZB261 ZB262 ZC202 ZC751 4C085 AA13 AA14 AA16 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41 BB43 CC22 CC23 EE01 4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA25 EA51 FA74

【要約の続き】

A)



B)

